



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113151396 A

(43) 申请公布日 2021.07.23

(21) 申请号 202110180443.3

(51) Int.Cl.

(22) 申请日 2015.06.19

C12Q 1/6804 (2018.01)

C12Q 1/6818 (2018.01)

(30) 优先权数据

62/015,799 2014.06.23 US

14/560,921 2014.12.04 US

(62) 分案原申请数据

201580040230.3 2015.06.19

(71) 申请人 斯坦福大学托管董事会

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 N·萨姆斯科 G·诺兰

Y·戈利采夫 D·R·麦基尔韦恩

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所

有限公司 11038

代理人 刘晓东

权利要求书1页 说明书45页

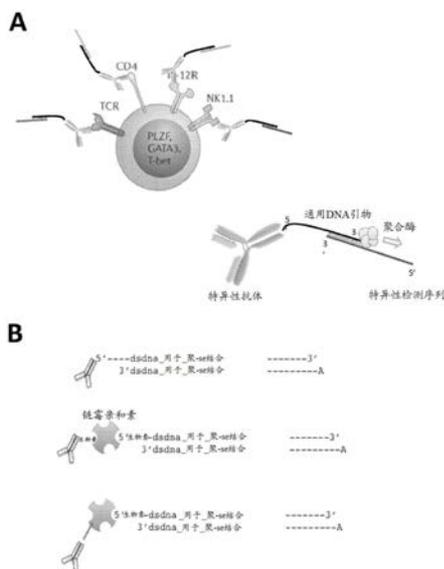
序列表47页 附图19页

(54) 发明名称

通过引物延伸进行载玻片上染色

(57) 摘要

本发明提供了一种分析平面样品的方法。在一些情况下,所述方法包括:(a) 用与核酸连接的捕获剂标记所述平面样品,其中所述捕获剂与所述平面样品中的互补位点特异性结合;(b) 使用荧光显微法,读取通过延伸与所述核酸杂交的引物所导致的荧光信号。本发明还提供所述方法的若干实施方式以及所述方法的多重变型。



1. 一种用于分析平面样品的方法,所述方法包括:
 - (a) 用捕获剂标记所述平面样品以产生标记样品,其中:
 - (i) 所述捕获剂与包含第一链和第二链的双链核酸连接;并且
 - (ii) 所述第一链或所述第二链的3'端或5'端可以使用另一链作为模板来延伸;
 - (b) 使所述标记样品与i. 聚合酶和多个核苷酸和/或ii. 标记寡核苷酸和连接酶接触,从而将所述多个核苷酸中的一个或多个核苷酸和/或标记寡核苷酸添加到所述双链核酸的一条链的末端上;以及
 - (c) 读取通过将所述一个或多个核苷酸和/或标记寡核苷酸添加到所述双链核酸的所述第一链或所述第二链中的一个上所产生的信号。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述信号是荧光信号。
3. 根据权利要求2所述的方法,其中读取包括荧光显微法。
4. 根据权利要求1所述的方法,其中所述捕获剂为抗体、适体或寡核苷酸探针。
5. 一种捕获剂,其与双链核酸连接,其中:
 - (i) 所述双链核酸包含第一链和第二链;
 - (ii) 所述捕获剂与所述第一链连接;以及
 - (iii) 所述第一链或所述第二链的5'端或3'端可以使用另一链作为模板来延伸。
6. 一种捕获剂组合物,其包含多种各识别不同互补位点的捕获剂,其中:

所述多种捕获剂中的每种与包含第一链和第二链的双链核酸连接;

所述第一链或第二链的5'端或3'端可以使用另一链作为模板来延伸;并且

紧接所述可延伸末端下游的模板对于所述多种捕获剂中的每种而言是不同的。
7. 一种用于分析平面样品的方法,其包括:
 - (a) 用权利要求6所述的捕获剂组合物标记所述平面样品;
 - (b) 使所述标记样品与i. 聚合酶和不完全核苷酸混合物或包含可逆终止子核苷酸的核苷酸混合物接触,从而将核苷酸添加到所述多种捕获剂中;和/或与ii. 标记寡核苷酸和连接酶接触,从而将标记寡核苷酸添加到所述多种捕获剂中;以及
 - (c) 读取通过将所述核苷酸或所述标记寡核苷酸添加到一些但非全部的所述多种捕获剂中所产生的信号。
8. 根据权利要求7所述的方法,其中所述双链核酸的延伸包括使所述平面样品与标记寡核苷酸和未标记寡核苷酸的混合物以及连接酶接触。
9. 根据权利要求7所述的方法,其中所述多种捕获剂是选自由以下组成的组:抗体、适体和寡核苷酸探针。
10. 一种试剂盒,其包含:
 - (a) 一种或多种捕获剂,其中所述一种或多种捕获剂可以与平面样品中的互补位点特异性结合。
 - (b) 一种或多种包含第一链第二链的双链核酸,其中所述一种或多种捕获剂中的每种与所述双链核酸连接,并且其中所述第一链或所述第二链的5'端或3'端可以使用另一链作为模板来延伸。

通过引物延伸进行载玻片上染色

[0001] 本申请是申请日为2015年6月19日、发明名称为“通过引物延伸进行载玻片上染色”的中国发明专利申请No.201580040230.3的分案申请。

[0002] 关于联邦资助研究的声明

[0003] 本研究是在政府支持下在国防部授予的合同W81XWH-12-1-0591下以及国家卫生院授予的合同GM104148和HHSN268201000034C下进行。政府享有本发明中的某些权利。

[0004] 交叉引用

[0005] 本专利申请主张2014年6月23日申请的美国临时申请序列号62/015,799和2014年12月4日申请的美国非临时申请序列号14/560,921的权益,这些专利申请在此通过引用整体并入。

[0006] 背景

[0007] 目前已有若干主要方法被用于单细胞抗原细胞术。其中最流行的是单细胞PCR、荧光激活流式细胞术、质谱细胞术和单细胞测序。这些(基于荧光和质谱的细胞术)方法受限于无法突破每个分析物(在这种情况下为细胞)100个参数以上的多重水平或无法实现高通量(单细胞测序)。另外,这些方法不适合或者不容易被修改以实现存档组织和基于载玻片的样品的细胞多重分析。

[0008] 本文公开了若干种用于捕获剂检测的相关方法,所述方法是基于用DNA标记捕获剂并且接着通过引物延伸来检测所述DNA。

[0009] 概要

[0010] 提供一种分析平面样品的方法。在一些情况下,所述方法可以包括:(a)用捕获剂(例如抗体或寡核苷酸探针)以产生标记样品的方式标记所述平面样品(例如组织切片),其中:(i)所述捕获剂与包含第一链和第二链的双链核酸连接;并且(ii)所述第一链或第二链的3'端或5'端可以使用另一链作为模板来延伸;(b)使所述标记样品与i.聚合酶和核苷酸混合物和/或ii.标记寡核苷酸和连接酶接触,从而将一个或多个核苷酸和/或标记寡核苷酸添加到所述双链核酸的一条链上;以及(c)使用荧光显微法,读取通过将所述一个或多个核苷酸和/或寡核苷酸添加到所述双链核酸的一条链上所产生的荧光信号,从而产生显示所述捕获剂与所述平面样品结合的图案的图像。

[0011] 所述方法可以各种不同方式来实施。例如,在一些实施方案中,步骤(b)可以使标记样品与聚合酶和包含荧光核苷酸的核苷酸混合物接触,从而将所述荧光核苷酸添加到所述双链核酸的一条链(即,顶链或底链,无论哪条链都具有可延伸3'端)上;以及步骤(c)可以包括读取通过将所述荧光核苷酸添加到所述双链核酸的一条链(即,顶链或底链,无论哪条链都具有可延伸3'端)上所产生的荧光信号。在这个实施方案中,所述荧光信号可以:i.从所添加的核苷酸直接发射;ii.由添加到一条链的3'端的两个荧光核苷酸之间的能量转移所产生的FRET信号;或iii.第一添加的荧光核苷酸(即,已添加到一条链上的荧光核苷酸)和第二荧光核苷酸(已存在于一条链中)之间的能量转移所产生的FRET信号。

[0012] 在替代实施方案中,步骤(b)包括使标记样品与连接酶和标记寡核苷酸接触,从而将所述标记寡核苷酸添加到所述双链核酸的一条链的3'端或5'端;以及步骤(c)包括读取

通过将所述标记寡核苷酸连接到所述双链核酸的一条链上所产生的荧光信号。在一些情况下,可延伸3'端可以通过聚合酶来延伸,并且与标记寡核苷酸连接。在这些实施方案中,所述荧光信号可以为:i.从所添加的核苷酸直接发射;ii.由添加到一条链的两个荧光核苷酸之间的能量转移所产生的FRET信号;或iii.添加一条链上的第一荧光核苷酸和已存在于另一链中的第二荧光核苷酸之间的能量转移所产生的FRET信号。

[0013] 在一些实施方案中,一条链的延伸从与另一链杂交并且位于第一链的下游的淬灭荧光标记寡核苷酸移除淬灭剂。

[0014] 在一些实施方案中,第一链为滚环扩增(RCA)产物,以及第二链包含与RCA产物中多个位点杂交的寡核苷酸。

[0015] 在其它实施方案中,第一链为寡核苷酸,以及第二链为与第一寡核苷酸杂交的第二寡核苷酸。在这些实施方案中,所述寡核苷酸可以经过设计以产生5'突出(overhang),使得第一链寡核苷酸的3'端可以使用另一寡核苷酸作为模板来延伸。在其它实施方案中,所述寡核苷酸可以经过设计以产生3'突出,使得第一链寡核苷酸的5'端可以使用另一寡核苷酸作为模板来连接。

[0016] 在任一实施方案中,所述平面样品可以为组织切片,例如福尔马林固定的石蜡包埋的(FFPE)组织切片。

[0017] 本文还提供与双链核酸连接的捕获剂,其中:(i)所述双链核酸包含第一链和第二链;(ii)所述捕获剂与第一链连接;以及(iii)第一链或第二链的3'端或5'端可以使用另一链作为模板来延伸。

[0018] 本文还提供捕获剂组合物,其包含多种识别不同互补位点的捕获剂,其中:每种捕获剂与包含第一链和第二链的双链核酸连接;所述捕获剂是通过第一链与双链核酸连接;第一或第二链的3'端或5'端可以使用另一链作为模板来延伸;紧接可延伸末端下游的模板对于每种捕获剂而言是不同的。在这些实施方案中,第一链的序列对于每种捕获剂而言是相同的;而第二链的序列对于每种捕获剂而言是不同的。

[0019] 在使用可逆终止子(“可逆终止子”方法)的实施方案中,与可延伸3'端紧邻的模板可以具有式 $3' - N_{4n}N_1/N_2/N_3 - 5'$,任选地在5'端后接具有随机核苷酸的短延伸物(例如,1-5个残基)以增加DNA双链体上的总体聚合酶驻留,其中 N_1 、 N_2 、 N_3 和 N_4 是选自G、A、T和C的不同核苷酸并且n是0、1或以上。在一些情况下,所述群体含有核苷酸 N_1 、 N_2 和 N_3 的单核苷酸突出或突出群体包含具有序列 $3' - N_4N_1 - 5'$ 、 $3' - N_4N_2 - 5'$ 和 $3' - N_4N_3 - 5'$ 的双核苷酸突出和任选地具有序列 $3' - N_4N_4N_1 - 5'$ 、 $3' - N_4N_4N_2 - 5'$ 和 $3' - N_4N_4N_3 - 5'$ 的突出等等(例如,具有序列 $3' - N_4N_4N_4N_1 - 5'$ 、 $3' - N_4N_4N_4N_2 - 5'$ 和 $3' - N_4N_4N_4N_3 - 5'$ 的四核苷酸突出)。还提供具有由这些式中任何一个界定的序列的寡核苷酸或RCA产物群体。在RCA实施方案中,可以在RCA产物的每个重复片段中发现所述序列。

[0020] 在这些实施方案中,与可延伸3'端紧邻的模板可以具有更一般式 $3' - XN_1/N_2/N_3 - 5'$,其中 N_1 、 N_2 、 N_3 是选自G、A、T和C的不同核苷酸并且X为具有随机组成和长度的具有碱基 X_i (使得 X_i 为选自G、A、T和C的不同核苷酸)的核苷酸延伸物。在一些情况下,所述群体可以包含具有序列 $3' - X_1N_1 - 5'$ 、 $3' - X_1N_2 - 5'$ 和 $3' - X_1N_3 - 5'$ 的双核苷酸突出和任选地具有序列 $3' - N_1X_1X_2 - 5'$ 、 $3' - N_2X_1X_2 - 5'$ 和 $3' - N_3X_1X_2 - 5'$ 的突出等等(例如,具有序列 $3' - N_1X_1X_2X_3 - 5'$ 、 $3' - N_2X_1X_2X_3 - 5'$ 和 $3' - N_3X_1X_2X_3 - 5'$ 的四核苷酸突出)。在许多实施方案中,这个群体另外含有核苷

酸 N_1 、 N_2 和 N_3 的单核苷酸突出。还提供具有由这些式中任何一个界定的序列的寡核苷酸或RCA产物群体。在RCA实施方案中,可以在RCA产物的每个重复片段中发现所述序列。

[0021] 在依赖“缺失碱基”方法的实施方案中,与可延伸3'端紧邻的模板可以具有式3'- YN_1/N_2 -5',任选地在5'端后接具有随机核苷酸的短延伸物(例如,1-5个残基)以增加DNA双链体上的总体聚合酶驻留,其中Y是由碱基 N_3 和 N_4 构成的长度为n(n为0、1或以上)的核苷酸序列,其中核苷酸 N_3 是在奇数位置而核苷酸 N_4 是在偶数位置,从突出的起点计数并且 N_1 、 N_2 、 N_3 和 N_4 是选自G、A、T和C的不同核苷酸。例如,在一些情况下,所述群体可以包含具有序列3'- N_1 -5'和3'- N_2 -5'或任选地3'- N_3N_1 -5'和3'- N_3N_2 -5'或3'- $N_3N_4N_1$ -5'和3'- $N_3N_4N_2$ -5'的5'突出和任选地具有序列3'- $N_3N_4N_3N_1$ -5'和3'- $N_3N_4N_3N_2$ -5'的突出等等(例如,具有序列3'- $N_3N_4N_3N_4N_1$ -5'和3'- $N_3N_4N_3N_4N_2$ -5'和随后3'- $N_3N_4N_3N_4N_3N_1$ -5'和3'- $N_3N_4N_3N_4N_3N_2$ -5'的突出)。还提供具有由这些式中任何一个界定的序列的寡核苷酸或RCA产物群体。在RCA实施方案中,可以在RCA产物的每个重复片段中发现所述序列。

[0022] 在这些实施方案中,与可延伸3'端紧邻的模板还可以具有更一般式3'- YN_1/N_2 -5',其中Y是长度为n(n为0、1或以上)的核苷酸序列,其由交替随机长度延伸的碱基 N_3 和 N_4 构成,使得 N_3 延伸物的序号是奇数而 N_4 延伸物的序号是偶数并且其中 N_1 、 N_2 、 N_3 和 N_4 是选自G、A、T和C的不同核苷酸。例如,所述群体可以包含具有序列3'- N_1 -5'和3'- N_2 -5'或任选地3'- $N_3N_3N_1$ -5'和3'- $N_3N_3N_2$ -5'或3'- $N_3N_3N_4N_1$ -5'和3'- $N_3N_3N_4N_2$ -5'的突出和任选地具有序列3'- $N_3N_3N_3N_3N_4N_4N_3N_3N_1$ -5'和3'- $N_3N_3N_3N_3N_4N_4N_3N_3N_2$ -5'的突出等等。还提供具有由这些式中任何一个界定的序列的寡核苷酸或RCA产物群体。在RCA实施方案中,可以在RCA产物的每个重复片段中发现所述序列。

[0023] 还提供一种分析组织样品的方法。在这些实施方案中,所述方法可以包括(a)用上述捕获剂组合物标记平面样品;(b)使标记样品与以下各项接触:i.聚合酶和不完全核苷酸混合物或包含可逆终止子核苷酸的核苷酸混合物和/或ii.标记寡核苷酸和连接酶;以及(c)使用荧光显微法,读取通过将核苷酸或标记寡核苷酸添加到一些但非全部的捕获剂中所产生的荧光信号。

[0024] 在这些实施方案中,所述方法可以包括:(c)使平面样品与聚合酶和以下各项接触:(i)包含与 N_1 、 N_2 和 N_3 互补的荧光核苷酸和与 N_4 互补的可逆终止子核苷酸的核苷酸混合物或(ii)包含与 N_1 和 N_2 互补的荧光核苷酸、与 N_3 互补的未标记核苷酸而不含与 N_4 互补的核苷酸的核苷酸混合物,从而将荧光核苷酸添加到一些但非全部捕获剂的双链核酸上;以及(d)使用荧光显微法,读取通过将荧光核苷酸添加到一些但非全部的捕获剂中所产生的荧光信号。

[0025] 在一些实施方案中,与可延伸3'端紧邻的模板具有式3'- $N_{4n}N_1/N_2/N_3$,其中 N_1 、 N_2 、 N_3 和 N_4 是选自G、A、T和C的不同核苷酸并且n为1或以上;以及步骤(c)包括使平面样品与聚合酶和核苷酸混合物接触,所述核苷酸混合物包含与 N_1 、 N_2 和 N_3 互补的荧光核苷酸和与 N_4 互补的可逆终止子核苷酸。

[0026] 在一些实施方案中,这种方法可以进一步包括:(e)灭活荧光信号,脱保护可逆终止子核苷酸以及阻断样品;以及(f)重复步骤(c)和(d)。在一些情况下,步骤(f)可以包括重复步骤(c)、(d)和(e)多次。

[0027] 在一些实施方案中,与可延伸3'端紧邻的模板可以具有式3'- YN_1/N_2 -5',任选地在

5' 端后接具有随机核苷酸的短延伸物(例如,1-5个残基)以增加DNA双链体上的总体聚合酶驻留,其中Y是由交替延伸的碱基 N_3 和 N_4 构成且其中 N_1 、 N_2 、 N_3 和 N_4 是选自G、A、T和C的不同核苷酸。

[0028] 在这些实施方案中,所述方法可以包括(e)灭活荧光信号并且使平面样品与聚合酶和与 N_4 互补的未标记核苷酸接触,以及(f)重复步骤(c)和(d)。在一些情况下,步骤(f)可以包括重复步骤(c)、(d)和(e)多次。

[0029] 在替代实施方案中,所述双链寡核苷酸可以各包含与第二链杂交的位于第一链下游的荧光标记寡核苷酸,其中所述荧光标记寡核苷酸包含淬灭剂,并且第一链的延伸从一些但非全部的淬灭荧光标记寡核苷酸移除淬灭剂,从而产生一些但非全部的捕获剂的荧光信号。

[0030] 在其它实施方案中,所述捕获剂与单链寡核苷酸连接,所述单链寡核苷酸可以未标记或经FRET受体荧光团标记。此类单链核苷酸并入与互补寡核苷酸杂交的专用序列,所述互补寡核苷酸欲用未标记碱基或经FRET激发荧光团标记的碱基延伸,从而产生一些但非全部的捕获剂的荧光信号。

[0031] 在一些实施方案中,一种用于分析平面样品的方法。在一些实施方案中,所述方法包括:(a)用捕获剂标记所述平面样品以产生标记样品,其中:(i)所述捕获剂与包含第一链和第二链的双链核酸连接;并且(ii)第一链或第二链的3'端或5'端可以使用另一链作为模板来延伸;(b)使标记样品与i.聚合酶和多个核苷酸和/或ii.标记寡核苷酸和连接酶接触,从而将多个核苷酸中的一个或多个核苷酸和/或标记寡核苷酸添加到所述双链核酸的一条链的末端;以及(c)读取通过将一或多个核苷酸和/或标记寡核苷酸添加到所述双链核酸的第一链或第二链中的一个上所产生的信号。在一些实施方案中,所述信号可以为荧光信号。在一些实施方案中,所述读取可以包括荧光显微法。在任一实施方案中,所述方法可以进一步包括产生显示所述捕获剂与所述平面样品结合的图案的图像。

[0032] 在任一实施方案中,步骤(b)可以包括使标记样品与聚合酶和包含荧光核苷酸的多个核苷酸接触,从而将荧光核苷酸添加到所述双链核酸的第一链或第二链中的一个上;以及步骤(c)包括读取通过将荧光核苷酸添加到所述双链核酸的第一链或第二链中的一个上所产生的荧光信号。在这些实施方案中,其中所述荧光信号可以为:i.从所添加的核苷酸直接发射;ii.由添加到所述双链核酸的第一链或第二链中的一个上的多个荧光核苷酸的两个荧光核苷酸之间的能量转移所产生的FRET信号;或iii.所添加的荧光核苷酸和第二荧光核苷酸(已存在于所述第一链或第二链双链核酸中的一个中)之间的能量转移所产生的FRET信号。

[0033] 在任一实施方案中,所述方法步骤(b)可以包括使标记样品与连接酶和标记寡核苷酸接触,从而将所述标记寡核苷酸添加到所述双链核酸的第一链或第二链中的一个上;以及步骤(c)包括读取通过将标记核苷酸添加到所述双链核酸的第一链或第二链中的一个上所产生的荧光信号。在这个实施方案中,所述荧光信号可以为:i.从所添加的标记核苷酸直接发射;ii.由添加到所述双链核酸的第一链或第二链中的一个上的两个标记核苷酸之间的能量转移所产生的FRET信号;或iii.由添加到所述双链核酸的第一链和第二链中的一个上的标记核苷酸和已存在于另一链的第二标记核苷酸之间的能量转移所产生的FRET信号。在这些实施方案中,所述标记核苷酸可以包含荧光核苷酸。

[0034] 在任一实施方案中,所述双链核酸的第一链或第二链中的一个的延伸可以从与另一条链杂交的位于第一链下游的淬灭荧光标记寡核苷酸移除淬灭剂。

[0035] 在任一实施方案中,所述双链核酸的第一链可以为滚环扩增(RCA)产物,而所述双链核酸的第二链包含与所述RCA产物中的多个位点杂交的寡核苷酸。

[0036] 在任一实施方案中,所述双链核酸的第一链可以为第一寡核苷酸,而所述双链核酸的第二链为与第一寡核苷酸杂交的第二寡核苷酸。

[0037] 在任一实施方案中,所述平面样品可以为福尔马林固定的石蜡包埋的(FFPE)切片。

[0038] 在任一实施方案中,所述捕获剂可以为抗体、适体(aptamer)或寡核苷酸探针。

[0039] 还提供与双链核酸连接的捕获剂。在一些实施方案中,(i)所述双链核酸包含第一链和第二链;(ii)所述捕获剂与第一链连接;以及(iii)第一链或第二链的5'端或3'端可以使用另一链作为模板来延伸。

[0040] 还提供一种捕获剂组合物,其包含多种各识别不同互补位点的捕获剂。在这些实施方案中,多种捕获剂各可以与包含第一链和第二链的双链核酸连接;第一链或第二链的5'端或3'端可以使用另一链作为模板来延伸;并且紧接可延伸末端下游的模板对于多种捕获剂中的每种而言可以不同的。在这些实施方案中,第一链的序列对于多种捕获剂中的每种而言可以相同的;而第二链的序列对于多种捕获剂中的每种而言可以不同的。

[0041] 在一些实施方案中,与可延伸3'端紧邻的模板可以具有式 $3' - N_{4n}N_1/N_2/N_3$,其中 N_1 、 N_2 、 N_3 和 N_4 是选自G、A、T和C的不同核苷酸并且 n 为1或以上。

[0042] 在一些实施方案中,与可延伸3'端紧邻的模板可以具有式 $3' - YN_1/N_2 - 5'$,任选地在5'端后接具有随机核苷酸的短延伸物以增加DNA双链体上的总体聚合酶驻留,其中 Y 是由交替延伸的 N_3 和 N_4 构成,且其中 N_1 、 N_2 、 N_3 和 N_4 是选自G、A、T和C的不同核苷酸。

[0043] 提供一种分析平面样品的方法。这种方法可以包括(a)用上文概述的捕获剂组合物标记所述平面样品;(b)使标记样品与i.聚合酶和不完全核苷酸混合物或包含可逆终止子核苷酸的核苷酸混合物接触,从而将核苷酸添加到多种捕获剂上;和/或与ii标记寡核苷酸和连接酶接触,从而将标记寡核苷酸添加到多种捕获剂上;以及(c)读取通过将核苷酸或标记寡核苷酸添加到一些但非全部的捕获剂中所产生的信号。在这些实施方案中,所述信号可以为荧光信号。在一些实施方案中,所述读取可以通过荧光显微法来完成。

[0044] 在一些实施方案中,所述方法可以通过以下来完成:(b)使所述平面样品与聚合酶和以下各项接触:(i)包含多个与 N_1 、 N_2 和 N_3 互补的荧光核苷酸和与 N_4 互补的可逆终止子核苷酸的核苷酸混合物或(ii)包含多个与 N_1 和 N_2 互补的荧光核苷酸、与 N_3 互补的未标记核苷酸而不含与 N_4 互补的核苷酸的核苷酸混合物,从而将荧光核苷酸添加到一些但非全部捕获剂的双链核酸上;以及(c)使用荧光显微法,读取通过将荧光核苷酸添加到一些但非全部捕获剂的双链核酸中所产生的荧光信号。在这些实施方案中,与可延伸3'端紧邻的模板可以具有式 $3' - N_{4n}N_1/N_2/N_3$,其中 N_1 、 N_2 、 N_3 和 N_4 是选自G、A、T和C的不同核苷酸并且 n 为1或以上;以及步骤(b)包括使平面样品与聚合酶和核苷酸混合物接触,所述核苷酸混合物包含多个与 N_1 、 N_2 和 N_3 互补的荧光核苷酸以及与 N_4 互补的可逆终止子核苷酸。在这些实施方案中,所述方法可以进一步包括:(d)灭活荧光信号;(e)任选地,脱保护可逆终止子核苷酸;(f)阻断样品;和(g)重复步骤(b)和(c)。在一些实施方案中,步骤(g)可以包括重复步骤(b)-(f)多次。

[0045] 在一些实施方案中,与可延伸3'端紧邻的模板可以具有式3'-YN₁/N₂-5',任选地在5'端后接具有随机核苷酸的短延伸物以增加DNA双链体上的总体聚合酶驻留,其中Y是由交替延伸的N₃和N₄构成,且其中N₁、N₂、N₃和N₄是选自G、A、T和C的不同核苷酸。在这些实施方案中,所述方法可以进一步包括:(d)灭活荧光信号;(e)使平面样品与聚合酶和与N₄互补的未标记核苷酸接触;以及(f)重复步骤(b)和(c)。在一些情况下,步骤(f)可以包括重复步骤(b)-(e)多次。

[0046] 在一些实施方案中,所述双链核苷酸各包含与第二链杂交的位于第一链下游的荧光标记寡核苷酸,其中所述荧光标记寡核苷酸包含淬灭剂,并且第一链的延伸从一些但非全部的淬灭荧光标记寡核苷酸移除淬灭剂,从而产生一些但非全部的捕获剂的荧光信号。

[0047] 在一些实施方案中,所述双链核酸的延伸包括使所述平面样品与标记寡核苷酸和未标记寡核苷酸的混合物以及连接酶接触。

[0048] 在任一实施方案中,多种捕获剂可以选自由以下组成的组:抗体、适体和寡核苷酸探针。

[0049] 还提供试剂盒。在这些实施方案中,所述试剂盒可以包含:(a)一种或多种捕获剂,其中所述一种或多种捕获剂可以与平面样品中的互补位点特异性结合。(b)一种或多种包含第一链第二链的双链核酸,其中所述一种或多种捕获剂中的每种与所述双链核酸连接,并且其中第一链或第二链的5'端或3'端可以使用另一链作为模板来延伸。在一些实施方案中,所述试剂盒可以进一步包含聚合酶或连接酶。在一些实施方案中,所述试剂盒可以进一步包含核苷酸混合物,其包含荧光核苷酸、未标记核苷酸和可逆终止子核苷酸中的至少一种。在一些实施方案中,所述一种或多种捕获剂可以选自由以下组成的组:抗体、适体和寡核苷酸探针。

[0050] 在一些方面中,提供一种分析平面样品的方法。在一些情况下,所述方法包括用捕获剂培养平面样品,培养条件为使所述捕获剂与所述平面样品中的互补位点特异性结合。在一些情况下,所述捕获剂与包含第一链和第二链的双链寡核苷酸连接。在一些情况下,第一链的3'端是相对于第二链的5'端凹进,从而产生突出。在一些情况下,所述方法包括使平面样品与聚合酶和多个核苷酸接触,从而将所述多个核苷酸中的一个或多个核苷酸添加到突出中。在一些情况下,所述方法包括读取通过将所述一个或多个核苷酸添加到突出中所产生的信号。在一些情况下,所述多个核苷酸包含多个荧光核苷酸。在一些情况下,所述多个核苷酸的荧光核苷酸是添加到突出中。在一些情况下,所述信号包含荧光信号。在一些情况下,所述荧光信号是从添加到所述突出中的荧光核苷酸直接发射。在其它情况下,所述多个荧光核苷酸中的两个被添加到突出中。在这个实施例中,所述荧光信号为由添加到突出中的多个荧光核苷酸中的两个之间的能量转移所产生的FRET信号。在替代实施例中,所述荧光信号为由添加到突出中的多个荧光核苷酸中的荧光核苷酸与存在于第二链中的荧光核苷酸之间的能量转移所产生的FRET信号。在一些情况下,第一链的延伸会从与第二链杂交的位于第一链下游的淬灭荧光标记核苷酸中移除淬灭剂。在一些情况下,所述平面样品为福尔马林固定的石蜡包埋的(FFPE)组织切片。在一些情况下,所述捕获剂是通过第一链的5'端与所述双链寡核苷酸连接。在其它情况下,所述捕获剂是通过第二链的3'端与所述双链寡核苷酸连接。在一些情况下,所述方法进一步包括使捕获剂与平面样品交联。在一些情况下,所述读取包括荧光显微法。在一些情况下,所述方法进一步包括产生显示所述捕获

剂与所述平面样品结合的图案的图像。在一些情况下,所述多个核苷酸中的一个或多个核苷酸是通过引物延伸添加到突出中。在一些情况下,所述捕获剂为抗体、适体或寡核苷酸探针。

[0051] 在一些方面中,提供一种组合物,其包含多种与平面样品中的不同互补位点特异性结合的捕获剂。在一些情况下,所述多种捕获剂中的每种与包含第一链和第二链的双链寡核苷酸连接。在一些情况下,各所述双链寡核苷酸中第一链的3'端是相对于第二链的5'端凹进,从而产生突出。在一些情况下,所述突出对于所述多种捕获剂中的每种而言是不同的。在一些情况下,所述多种捕获剂中的每种通过第一链的5'端与所述双链寡核苷酸连接。在其它情况下,所述多种捕获剂中的每种通过第二链的3'端与所述双链寡核苷酸连接。在一些情况下,第一链的序列对于所述多种捕获剂中的每种而言是相同的而第二链的序列对于所述多种捕获剂中的每种而言是不同的。在一些情况下,所述突出具有式 $3' - N_4nN_1/N_2/N_3$,其中 N_1 、 N_2 、 N_3 和 N_4 是选自G、A、T和C的不同核苷酸并且 n 为1或以上。在其它情况下,所述突出具有式 $3' - YN_1/N_2 - 5'$,任选地在5'端后接具有随机核苷酸的短延伸物以增加DNA双链体上的总体聚合酶驻留,其中 Y 是由交替延伸的 N_3 和 N_4 构成,且其中 N_1 、 N_2 、 N_3 和 N_4 是选自G、A、T和C的不同核苷酸。在一些情况下, Y 为具有长度 n 的核苷酸序列且其中 n 为0、1或以上。在一些情况下, N_3 延伸物的序号为奇数且其中 N_4 延伸物的序号为偶数。在一些情况下,所述平面样品为福尔马林固定的石蜡包埋的切片(FFPE)。在一些情况下,所述多种捕获剂为抗体、适体或寡核苷酸探针。

[0052] 在一些方面中,提供一种分析平面样品的方法。在一些情况下,所述方法包括用上述组合物培养平面样品,培养条件为使多种捕获剂中的每种与平面样品中的不同互补位点特异性结合。在一些情况下,所述方法包括使平面样品与聚合酶和多个核苷酸接触,从而将所述多个核苷酸中的一个或多个核苷酸添加到一些但非全部的所述多种捕获剂的突出中。在一些情况下,所述方法包括读取通过将所述多个核苷酸中的一个或多个核苷酸添加到一些但非全部的捕获剂的突出中所产生的信号。在一些情况下,所述方法进一步包括使多种捕获剂与平面样品交联。在一些情况下,所述多个核苷酸包含不完全核苷酸混合物或含可逆终止子核苷酸的核苷酸混合物。在一些情况下,所述信号包含荧光信号。在一些情况下,所述读取包含荧光显微法。在一些情况下,所述方法进一步包含产生显示所述多种捕获剂与所述平面样品结合的图案的图像。在一些情况下,所述多个核苷酸包含:(i)多个与 N_1 、 N_2 和 N_3 互补的荧光核苷酸和与 N_4 互补的可逆终止子核苷酸或;或(ii)多个与 N_1 和 N_2 互补的荧光核苷酸、与 N_3 互补的未标记核苷酸而不含与 N_4 互补的核苷酸。在一些情况下,所述多个荧光核苷酸中的荧光核苷酸是添加到一些但非全部的所述多种捕获剂的突出上。在一些情况下,所述信号包含通过将所述多个荧光核苷酸中的荧光核苷酸添加到一些但非全部的所述多种捕获剂中所产生的荧光信号。在一些情况下,所述读取包含荧光显微法。在一些情况下,所述方法进一步包含产生显示所述多种捕获剂与所述平面样品结合的图案的图像。在一些情况下,所述突出具有式 $3' - N_4nN_1/N_2/N_3$,其中 N_1 、 N_2 、 N_3 和 N_4 是选自G、A、T和C的不同核苷酸并且 n 为1或以上,且其中所述多个核苷酸包含多个与 N_1 、 N_2 和 N_3 互补的荧光核苷酸和与 N_4 互补的可逆终止子核苷酸。在一些情况下,所述方法进一步包括灭活荧光信号;任选地,脱保护可逆终止子核苷酸;阻断平面样品;以及重复接触和读取步骤。在一些情况下,所述重复进一步包括重复接触、读取、灭活、任选脱保护和阻断步骤多次。在其它情况下,所述

突出具有式3'-YN1/N2-5'，任选地在第一链的5'端后接具有随机核苷酸的短延伸物以增加DNA双链体上的总体聚合酶驻留，其中Y是由交替延伸的N3和N4构成，并且其中N1、N2、N3和N4是选自G、A、T和C的不同核苷酸。在一些情况下，Y为具有长度n的核苷酸序列且其中n为0、1或以上。在一些情况下，N3延伸物的序号为奇数且其中N4延伸物的序号为偶数。在一些情况下，所述方法进一步包括灭活荧光信号；使平面样品与聚合酶和与N4互补的未标记核苷酸接触；以及重复接触和读取步骤。在一些情况下，所述重复包括重复接触、读取、灭活和接触步骤多次。在一些情况下，所述双链寡核苷酸中的每种包含与第二链杂交的位于第一链下游的荧光标记寡核苷酸，其中所述荧光标记寡核苷酸包含淬灭剂，并且第一链的延伸会从一些但非全部的淬灭荧光标记寡核苷酸移除淬灭剂，从而产生一些但非全部的捕获剂的荧光信号。

[0053] 附图简述

[0054] 技术人员将明白下文所述的附图仅用于说明性目的。这些附图无意以任何方式限制本教导的范围。

[0055] 图1A-1B(A)示意性说明由与双链寡核苷酸缀合的捕获剂的组合所构成的检测试剂。在检测和移除未结合的检测试剂之后，通过聚合酶驱动的引物延伸来呈现结合图案。(B)图示意性说明将捕获剂(在这种情况下为抗体，但不排除其它可能的捕获剂)与双链寡核苷酸连接的三种方法(即，通过使顶链寡核苷酸与捕获剂化学缀合；使用链霉亲和素作为中间体以连接生物素化抗体和生物素化寡核苷酸；以及通过将生物素化寡核苷酸连接到与链霉亲和素化学缀合的抗体上)。

[0056] 图2示意性说明与具有不同突出的双链寡核苷酸结合的捕获剂的实例。此类不同突出代表通过倍增下链寡核苷酸中与检测碱基(在此情况下为dU)互补的位置来增加从特定捕获剂获得的信号的策略。下图还显示如何可以使用经不同荧光团标记的不同碱基作为“检测”碱基的FRET激发对。SEQ ID NO:1-4。

[0057] 图3示意性说明依赖于可逆染料终止子的多重检测方法的若干循环。

[0058] 图4示意性说明依赖于每次循环省去四种核苷酸中的一种的多重检测方法的若干循环。

[0059] 图5A-5D示意性说明用于“可逆终止子”和“缺失碱基”多重方法的寡核苷酸双链体的示意性设计。SEQ ID NO:5-12。

[0060] 图6示意性说明用于以下策略的寡核苷酸双链体的示意性设计：允许技术人员减小下链寡核苷酸长度，从而在高度复合捕获剂组的情况下产生突出。SEQ ID NO:13-30。

[0061] 图7示意性说明依赖于通过切口平移从标记寡核苷酸移除淬灭剂的检测方法的实例。SEQ ID NO:31-35。

[0062] 图8示意性说明依赖于从标记寡核苷酸移除淬灭剂的多重检测方法。步骤1:SEQ ID NO 36-44,步骤2:SEQ ID NO:45-52,步骤3:SEQ ID NO:53-60,步骤4:SEQ ID NO:61-67。

[0063] 图9A和9B示意性说明依赖于聚合酶引发核苷酸的循环再退火的实施方案和所述方法的利用FRET的变型。SEQ ID NO:68-80。

[0064] 图10示意性说明依赖于聚合酶引发核苷酸的循环再退火的实施方案和所述方法的利用FRET的变型。SEQ ID NO:81-86。

[0065] 图11A-11C显示与经过设计以通过引物延伸呈现染色的寡核苷酸双链体连接的抗-CD4抗体(A图)和在缺乏聚合酶下(B图)和在存在聚合酶下(C图)从悬浮的标记脾脏细胞群体获得的数据。SEQ ID NO:87和88。

[0066] 图12A-12D显示从通过引物延伸标记预先附着在载玻片上的脾脏细胞群体所获得的数据。细胞是用“常规”TCRb-FITC抗体和CD4抗体共染色,CD4抗体与经过设计以通过引物延伸呈现染色的寡核苷酸双链体连接。

[0067] 图13A-13D显示两种与寡核苷酸双链体连接的捕获剂CD4和CD8的示意性说明(A图)和从多重方法获得的数据,通过所述多重方法,使用“可逆终止子”方法对涂抹于载玻片上的脾脏细胞依序检测这些捕获剂的染色(C-D图)。SEQ ID NO:89-92。

[0068] 图14显示测试通过“缺失碱基”方法进行的多重染色的实验的示意性程序。小鼠脾脏细胞样品是由与每个样品特异性寡核苷酸双链体缀合的泛白血病CD45抗体条码化。样品在染色后混合并且混合物通过依序呈现CD45-寡核苷酸变型来解析。

[0069] 图15是显示呈现由CD45条码化(根据图14中的方案)的30个群体的前6个循环的12组图像。每个呈现循环共检测(co-detect)两个群体。在每个循环中,对照图像是在荧光灭活后获得。

[0070] 图16说明利用滚环扩增增强的抗体信号。A.使用由抗体、共价连接的线性接头寡核苷酸和5'-磷酸化挂锁核苷酸组成的抗-DNA缀合物以染色细胞抗原。挂锁探针含有检测引物序列(橙色),后接荧光核苷酸并入位点(T)。B.用T4 DNA连接酶处理挂锁寡核苷酸,从而诱导其环化。C.利用链置换phi29 DNA聚合酶的滚环扩增产生检测引物位点(绿色)的可逆互补的重复。F-G.利用抗体-DNA缀合物进行的小鼠脾脏细胞染色在没有滚环扩增的情况下(F)以及在滚环扩增之后(G)以dUTP-Cy5通过引物延伸而可视化。

[0071] 图17显示细胞的荧光图像,其显示由迭代引物延伸方案所呈现的22种不同抗原的染色。在每个循环中,一种抗原-抗体-DNA复合物并入dUTP-SS-Cy5荧光团(红色)以及一种复合物并入dCTP-SS-Cy3(绿色),所有其它复合物接收未标记‘行走’碱基(在奇数循环时为dGTP,在偶数循环时为dATP)。

[0072] 图18显示A:多组设计,通过所述多组设计,抗体-DNA缀合物因为3'-二脱氧-终止子碱基而无法进行聚合酶延伸,但每组可以通过添加组特异性引物而被激活以独立于其它组进行延伸。B:将18等分试样的小鼠脾脏细胞用经过此类设计的不同CD45抗体缀合物进行独立染色。等分试样1-3(组1)可以通过常规ABseq引物延伸(顶行)加以检测,等分试样4-6(组2)是在添加间隔区(Spacer)1寡核苷酸引物后加以延伸,以及等分试样7-9(组3)可以在添加间隔区2寡核苷酸引物后加以延伸。C:图像定量的结果。个别细胞强度的强度以条形码形式显示,每行一个细胞,红色表示较高染色强度。列表示每个延伸循环的细胞强度。斜纹图案显示基于间隔区的延伸的高特异性以及组与延伸循环之间不存在信号串音(signal cross-talk)。

[0073] 图19显示:A.一对偶遇检测探针与靶RNA杂交。上游寡核苷酸探针(夹板引物(Splint-primer))充当夹板以供下游寡核苷酸探针(挂锁)的环化和连接。挂锁探针含有检测引物序列(lilac),后接荧光核苷酸并入位点(红色)。B.滚环扩增是在上游探针的3'端开始并且产生检测引物序列(lilac)的可逆互补的多个拷贝。C.使检测引物退火至扩增产物的多个位点。D.以dUTP-Cy5进行的聚合酶反应导致并入。E-F:NALM细胞中的细小明亮色斑

对应单一HLADRA RNA分子,其在阴性对照Jurkat细胞中不存在。两种组中存在的较大红色团对应不特异性结合荧光核苷酸的凋亡细胞。

[0074] 图20显示依赖于引物延伸和短标记寡核苷酸连接的替代方法。左侧,从上到下:SEQ ID NO:93-108;右侧,从上到下:SEQ ID NO:109-124。

[0075] 图21描绘一种允许用户检测、分析和处理样品图像的系统。

[0076] 定义

[0077] 除非本文另有定义,否则本文所用的所有技术和科学术语具有本发明所属领域的一般技术人员所普遍理解的含义。虽然与本文所述的那些方法和材料类似或等效的任何方法和材料都可以用于本发明实践和测试中,但描述优选的方法和材料。

[0078] 文中提到的所有专利和公开(包括所有此类专利和公开中所公开的所有序列)通过引用明确并入。

[0079] 数值范围包括界定所述范围的数字。除非另有指定,否则分别地核酸以5'到3'的方向从左到右书写;氨基酸序列以氨基到羧基的方向从左到右书写。

[0080] 本文所提供的标题并不是对本发明各个方面或实施方案的限制。因此,下文即将被定义的术语可以通过完整地参考本说明书而被更全面地定义。

[0081] 除非另有定义,否则本文所用的所有技术和科学术语具有本发明所属领域的一般技术人员所普遍理解的含义。Singleton等人,DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY,2D ED.,John Wiley and Sons,New York(1994)和Hale&Markham,THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY,Harper Perennial,N.Y.(1991)为技术人员提供了本文所用的诸多术语的通用含义。为简明起见和便于参考,下文仍定义了某些术语。

[0082] 如本文所使用,术语“感兴趣生物特征”是指细胞的可以通过与捕获剂结合而被指示的任何部分。示意性的感兴趣生物特征包括细胞壁、细胞核、细胞质、细胞膜、角蛋白、肌肉纤维、胶原、骨头、蛋白质、核酸(例如,mRNA或基因组DNA等)、脂肪等。感兴趣生物特征还可以通过免疫组织方法(例如与寡核苷酸连接的捕获剂)来指示。在这些实施方案中,所述捕获剂结合到样品中的位点(例如蛋白质表位)。示意性表位包括但不限于癌胚抗原(用于识别腺癌)、细胞角蛋白(用于识别癌但还可以表现于一些肉瘤中)、CD15和CD30(用于识别霍奇金氏病)、 α 胎蛋白(用于识别卵黄囊瘤和肝细胞癌)、CD117(用于识别胃肠道间质瘤)、CD10(用于识别肾细胞癌和急性淋巴细胞白血病)、前列腺特异性抗原(用于识别前列腺癌)、雌激素和孕酮(用于肿瘤识别)、CD20(用于识别B-细胞淋巴瘤)、CD3(用于识别T-细胞淋巴瘤)。样品中的互补核酸分子(例如DNA和/或RNA)为寡核苷酸探针提供结合互补位点。

[0083] 如本文所使用,术语“多重”是指使用多于一种标记以同时或依序检测和测量生物活性材料。

[0084] 如本文所使用,术语“抗体”和“免疫球蛋白”在文中可以互换使用并且被所属领域中的技术人员所熟知。这些术语是指由一条或多条特异性结合抗原的多肽构成的蛋白质。抗体的一种形式组成抗体的基本结构形式。这种形式是四聚体并且由相同的两对抗体链构成,每对抗体链具有一条轻链和一条重链。在每对中,轻链和重链可变区一起负责与抗原结合,而恒定区负责抗体效应子功能。

[0085] 已识别的免疫球蛋白多肽包括 κ 和 λ 轻链和 α 、 γ (IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄)、 δ 、 ϵ 和 μ 重链或其它类型等效物。全长免疫球蛋白“轻链”(具有约25kDa或约214个氨基酸)包含位于

NH₂-端的约110个氨基酸的可变区和位于COOH-端的κ或λ恒定区。全长免疫球蛋白“重链”（具有约50kDa或约446个氨基酸）类似地包含可变区（具有约116个氨基酸）和前述重链恒定区之一，例如γ（具有约330个氨基酸）。

[0086] 术语“抗体”和“免疫球蛋白”包括任何同种型的抗体或免疫球蛋白、保留与抗原特异性结合的抗体片段（包括但不限于Fab、Fv、scFv和Fd片段）、嵌合抗体、人源化抗体、微抗体、单链抗体和包含抗体的抗原结合部分和非抗体蛋白质的融合蛋白。这个术语还涵盖了Fab'、Fv、F(ab')₂和或其它保留与抗原特异性结合的抗体片段、以及单克隆抗体。抗体可以各种其它形式存在，包括例如Fv、Fab和(Fab')₂以及双功能（即，双特异性）杂合抗体（例如Lanzavecchia等人，Eur. J. Immunol. 17, 105 (1987)）以及单链（例如Huston等人，Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85, 5879-5883 (1988) 和Bird等人，Science, 242, 423-426 (1988)，这些文献在此通过引用并入）。（一般参见Hood等人“Immunology”，Benjamin, N.Y.，第2版(1984)，和Hunkapiller and Hood, Nature, 323, 15-16 (1986)，）。

[0087] 术语“特异性结合”是指结合试剂优先结合至不同分析物的均匀混合物中存在的特定分析物的能力。在某些实施方案中，特异性结合相互作用将辨别样品中的所需分析物和非所需分析物，在一些实施方案中，多于约10到100倍或以上（例如，多于约1000倍或10,000倍）。

[0088] 在某些实施方案中，当结合试剂与分析物特异性结合成捕获剂/分析物复合物时，结合试剂与分析物之间的亲和力的特征为K_D（解离常数）小于10⁻⁶M、小于10⁻⁷M、小于10⁻⁸M、小于10⁻⁹M、小于10⁻⁹M、小于10⁻¹¹M或小于约10⁻¹²M或以下。

[0089] “多个”含有至少2个成员。在某些情况下，多个可以具有至少2、至少5、至少10、至少100、至少1000、至少10,000、至少100,000、至少10⁶、至少10⁷、至少10⁸或至少10⁹或更多个成员。

[0090] 如本文所使用，术语“标记”是指使可检测荧光团与样品中的特异性位点（例如，含有用于所用抗体的表位的位点，例如）附接使得所述位点的存在和/或丰度可以通过评估所述标记的存在和/或丰度加以确定。

[0091] 术语“标记”是指一种产生标记样品的方法，在所述方法中，任何必要步骤以任何便利顺序进行，只要产生所需标记样品即可。例如，在一些实施方案中以及如下文即将举例，所述捕获剂可以在抗体与样品结合之前已经与双链核酸连接，在这种情况下样品可以使用相当少步骤加以标记。在其它实施方案中，所述捕获剂可以在其与样品培养时与双链核酸的第一链连接。在这些实施方案中，所述双链核酸的第二链可以在抗体已与样品结合之后与所述双链核酸的第一链杂交。沿着相似路径，所述捕获剂可以在其与样品培养时与滚环扩增（RCA）引物连接。在这些实施方案中，所述双链核酸可以通过以下方式产生：a) 使样品与具有与RCA引物互补的末端的挂锁探针杂交，将所述挂锁探针的末端连接在一起，以及通过滚环扩增拷贝所述挂锁探针；b) 使寡核苷酸与所述RCA产物杂交，如图16中所示。在这个实施例中，所述RCA产物是所述双链核酸的第一链，以及与所述RCA产物杂交的寡核苷酸是所述双链核酸的第二链。在许多实施方案中，所述标记步骤可以包括使所述捕获剂与所述平面样品交联，使得后续操作可以在所述捕获剂未与所述平面样品中的其互补位点解离的情况下完成。在这些实施方案中，如果所述捕获剂是在所述抗体与所述样品结合之前与所述双链核酸连接，那么所述交联步骤可以在所述抗体与所述样品结合之后即刻完

成。在其中所述捕获剂在其与所述样品培养时仅与第一链(或用于制造第一链的RCA引物)连接的实施方案中,所述样品可以在所述抗体与所述样品结合之后交联,而所述双链可以在交联之后产生。

[0092] 如本文所使用,术语“平面样品”是指大体上平面(即,二维)材料(例如,玻璃、金属、陶瓷、有机聚合物表面或凝胶),其含有细胞或来源于细胞的生物分子(例如,蛋白质、核酸分子、脂质、寡/多糖、生物分子复合物、细胞器、细胞碎片或分泌物(外来体、微泡))的任何组合。平面细胞样品可以通过例如使细胞在平面上生长,使细胞沉积在平面上(例如通过离心),通过将含有细胞的三维物体切成切片并将切片安装到平面上(即,产生组织切片),使细胞组分吸收于经亲和剂(例如抗体、半抗原、核酸探针)功能化的表面上,将生物分子引入聚合物凝胶中或将它们通过电泳或其它方式转移到聚合物表面上。所述细胞或生物分子可以使用任何数量的试剂(包括福尔马林、甲醇、多聚甲醛、甲醇:乙酸、戊二醛、双官能交联剂例如双(琥珀酰亚胺基)辛二酸酯、双(琥珀酰亚胺基)聚乙二醇等)加以固定。这个定义希望涵盖细胞样品(例如,组织切片等)、电泳凝胶和其印迹、免疫印迹、斑点印迹、ELISA、抗体微阵列、核酸微阵列等。

[0093] 如本文所使用,术语“组织切片”是指已从受试者获得,固定,切片并且安装到平面(例如显微镜载玻片)上的一片组织。

[0094] 如本文所使用,术语“福尔马林固定的石蜡包埋的(FFPE)组织切片”是指已经过以下处理的组织片(例如活检):已从受试者获得,固定在甲醛(例如,溶于磷酸生理盐水中的3%-5%甲醛)或布安氏溶液中,包埋于石蜡中,切成薄片,以及随后安装在显微镜载玻片上。

[0095] 如本文所使用,术语“空间可寻址测量”是指各与表面上的特定位置有关的一组值。空间可寻址测量可以映射到样品中的位置并且可以用于重构所述样品的图像。

[0096] “诊断标记物”是具有适用于检测疾病,测量疾病的进展或治疗效果或测量感兴趣方法的特定分子特征的体内特定生化指标。

[0097] “病理指示”细胞是当存在于组织中时,指示所述组织所属的动物(或获得所述组织的动物)罹患疾病或障碍的细胞。举例而言,动物的肺组织中一个或多个乳腺癌细胞的存在指示所述动物罹患转移性乳腺癌。

[0098] 术语“互补位点”是用于指用于抗体或适体的表位或者如果捕获剂为寡核苷酸探针则为核酸分子。具体来说,如果捕获剂是抗体,那么用于捕获剂的互补位点是样品中与抗体结合的表位。如果捕获剂是寡核苷酸探针,那么用于捕获剂的互补位点是样品中DNA或RNA分子中的互补序列。

[0099] 如本文所使用的术语“表位”定义为抗原分子上被抗体结合的小化学基团。抗原可以具有一个或多个表位。在许多情况下,表位是在尺寸上概略地为五个氨基酸或糖。所属领域中的技术人员明白:大致上,分子的总体三维结构或特定线性序列可以为抗原特异性的主要标准。

[0100] 诊断或治疗的“受试者”为植物或动物,包括人类。用于诊断或治疗的非人类动物受试者包括例如家畜和宠物。

[0101] 如本文所使用,术语“培养”是指将平面样品和捕获剂维持在适用于所述捕获剂与所述平面样品中的分子(例如表位或互补核酸)特异性结合的条件(所述条件包括一段时

间、温度、适宜结合缓冲液和冲洗)下。

[0102] 如本文所使用,术语“捕获剂”是指可以与平面样品中的互补位点特异性结合的试剂。示意性捕获剂包括与结合位点杂交的例如抗体、适体和核酸(例如寡核苷酸)探针(其可以为DNA或RNA)。如果使用抗体,那么在许多情况下,所述抗体可以与蛋白质表位结合。如果使用核酸探针,那么所述核酸探针可以与例如基因组DNA或RNA结合(使得细胞内RNA的位置和丰度可以被检测)。

[0103] 如本文所使用,在例如“可以使用另一链作为模板来延伸的3'端”的内容中,术语“可延伸”意指聚合酶或连接酶可以添加到核酸分子的3'端,其中紧接3'端下游的模板序列(即,在另一链上)决定添加哪种核苷酸(如果使用聚合酶)或寡核苷酸(如果使用连接酶)。“可以使用另一链作为模板来延伸的5'端”意指连接酶可以将寡核苷酸添加到核酸分子的5'端,其中紧接5'端下游的模板序列(即,在另一链上)决定添加哪种寡核苷酸。

[0104] 如本文所使用,术语“紧接3'端下游的模板序列”是指另一条链上的用作模板以延伸3'端的序列,其以第一核苷酸开始。在其中第一链是RCA产物的实施方案中,紧接3'端下游的模板序列可以为所述RCA产物中的序列。在其中第一链是寡核苷酸的实施方案中,紧接3'端下游的模板序列可以为5'突出。

[0105] 如本文所使用,术语“与双链核酸连接的捕获剂”是指与双链核酸(其可以由两条杂交在一起的单链寡核苷酸组成,或为与多个寡核苷酸杂交的RCA产物)非共价(例如经由链霉亲和素/生物素相互作用)或共价(例如经由点击反应或类似方法)连接的捕获剂(例如抗体或寡核苷酸探针),连接方式为使所述捕获剂仍可以与其结合位点结合以及一条核酸的3'端可以接近聚合酶和/或连接酶。所述核酸和所述捕获剂可以经由许多不同方法来连接,包括使用马来酰亚胺或含卤素基团(其为半胱氨酸反应性)的方法。所述捕获剂和所述核酸可以连接在所述双链核酸的一条链的5'端附近或5'端、所述双链核酸的一条链的3'端附近或3'端或其间的任何位置。

[0106] 术语“核酸”和“多核苷酸”在文中可以互换使用以描述由核苷酸(例如脱氧核苷酸、核糖核苷酸或其组合)组成的具有任何长度(例如大于约2个碱基、大于约10个碱基、大于约100个碱基、大于约500个碱基、大于1000个碱基、至多约10,000或更多个碱基)的聚合物,并且可以酶法或合成法来产生(例如,美国专利第5,948,902号和其中所引用的文献中所述的PNA)并且其可以与两条天然生成核酸的序列特异性方式类似的序列特异性方式与天然生成核酸杂交,例如可以参与沃森-克里克(Watson-Crick)碱基配对相互作用。天然生成核苷酸包括鸟嘌呤、胞嘧啶、腺嘌呤、胸腺嘧啶、尿嘧啶(分别为G、C、A、T和U)。DNA和RNA分别具有脱氧核糖和核糖糖骨架,而PNA的骨架是由通过肽键连接的重复N-(2-氨基乙基)-甘氨酸单元组成。在PNA中,各种嘌呤和嘧啶碱基是通过亚甲基羰基键与骨架连接。锁核酸(LNA)(通常称作不可接近的RNA)是一种修饰型RNA核苷酸。LNA核苷酸的核糖部分是经过连接2'氧和4'碳的额外桥修饰。桥“锁住”了核糖的3'-内(北)构型(其通常发现于A型双链体中)。每当需要时,LNA核苷酸可以与寡核苷酸中的DNA或RNA残基混合。术语“非结构化核酸”或“UNA”是含有以低稳定性彼此结合的非天然核苷酸的核酸。例如,非结构化核酸可以含有G'残基和C'残基,其中这些残基对应G和C的非天然生成形式(即类似物),其以低稳定性彼此碱基配对,但保留分别与天然生成C和G残基碱基配对的能力。非结构化核酸描述于US20050233340中,出于揭示UNA,US20050233340在此通过引用并入。

[0107] 如本文所使用,术语“寡核苷酸”是指具有至少10个(例如至少15或至少30个)核苷酸的多聚体。在一些实施方案中,寡核苷酸可以介于15-200个核苷酸长度或更多的范围内。

[0108] 如本文所使用,在读取荧光信号的内容中,术语“读取”是指通过扫描或通过显微法获得图像,其中所述图像显示视野中的荧光图案以及荧光强度。

[0109] 如本文所使用,术语“引物”是一种天然的或合成的寡核苷酸,其在与多核苷酸模板形成双链体后能够充当核酸合成的起点并且从其3'端沿着所述模板延伸使得形成延伸的双链体。在延伸过程中所添加的核苷酸的序列是由模板多核苷酸的序列确定。通常,引物是通过DNA聚合酶来延伸。引物可以为至少10(例如至少15或至少30)个核苷酸长度。

[0110] 如本文所使用,术语“单核苷酸5'突出”是指其中所述突出为单核苷酸长度的5'突出。同样地,“双核苷酸5'突出”是指其中所述突出为双核苷酸长度的5'突出。3'端是凹进于5'突出中。

[0111] 在某些情况下,突出的各个核苷酸可以由其位置(例如“第一位置”和“第二位置”)来表示。在这些情况下,所述“位置”是相对于凹进3'端。因此,在多碱基5'突出中,所述突出的“第一”位置是紧邻凹进3'端以及所述突出的“第二”位置是紧邻所述第一位置。

[0112] 在某些情况下,双链寡核苷酸或核酸的互补链可以在文中称作“第一”和“第二”或“顶”和“底”链。链分配为“顶”和“底”链是任意的并且不暗示任何特定方向、功能或结构。

[0113] 如本文所使用,在读取通过添加荧光核苷酸所产生的荧光信号的内容中,术语“通过...所产生的信号”是指从荧光核苷酸直接发射的信号;经由能量转移到另一荧光核苷酸而间接发射的信号(即通过FRET)。

[0114] 如本文所使用,术语“包含淬灭剂的荧光标记寡核苷酸”是指含有荧光团和淬灭剂的寡核苷酸,其中所述淬灭剂淬灭相同寡核苷酸中的荧光团。

[0115] 如本文所使用,在不同的不同5'突出的内容中,术语“不同”是指具有不同序列的突出。具有不同长度的突出(例如GATC相对于GAT)隐含地具有不同序列,即使一个序列可以被另一个序列所涵盖。

[0116] 如本文所使用,术语“突出”是指其中双链核酸的一条链结束,使得核酸合成可以从这条链开始使用另一链作为模板通过聚合酶(或寡核苷酸可以通过连接酶与所述末端连接)进行的结构。

[0117] 如本文所使用,在将一个或多个核苷酸或寡核苷酸添加到可延伸3'端的内容中,术语“添加到可延伸3'端”是指使用另一链作为模板,将核苷酸(或寡核苷酸)添加到可延伸3'端(例如,使用5'突出作为模板,添加到5'突出的凹进3'端)。

[0118] 如本文所使用,术语“具有式 $3' - N_4 n N_1 / N_2 / N_3 - 5'$ 的模板,任选地在5'端后接具有随机核苷酸的短延伸物(例如,1-5个残基)以增加DNA双链体上的总体聚合酶驻留,其中 N_1 、 N_2 、 N_3 和 N_4 是选自G、A、T和C的不同核苷酸并且n是0、1或以上”是指一群潜在地含有核苷酸 N_1 、 N_2 和 N_3 的单核苷酸突出的序列或突出群体包含具有序列 $3' - N_4 N_1 - 5'$ 、 $3' - N_4 N_2 - 5'$ 和 $3' - N_4 N_3 - 5'$ 的双核苷酸突出和任选地具有序列 $3' - N_4 N_4 N_1 - 5'$ 、 $3' - N_4 N_4 N_2 - 5'$ 和 $3' - N_4 N_4 N_3 - 5'$ 的突出等等(例如,具有序列 $3' - N_4 N_4 N_4 N_1 - 5'$ 、 $3' - N_4 N_4 N_4 N_2 - 5'$ 和 $3' - N_4 N_4 N_4 N_3 - 5'$ 的四核苷酸突出)。

[0119] 如本文所使用,术语“具有式 $3' - Y N_1 / N_2 - 5'$ 的模板,任选地在5'端后接具有随机核苷酸的短延伸物(例如,1-5个残基)以增加DNA双链体上的总体聚合酶驻留,其中Y是由碱基 N_3 和 N_4 构成的长度为n(n为0、1或以上)的核苷酸序列,其中核苷酸 N_3 是在奇数位置而核苷酸

N_4 是在偶数位置,从突出的起点计数并且 N_1 、 N_2 、 N_3 和 N_4 是选自G、A、T和C的不同核苷酸”是指潜在地包含以下各项的序列群体:序列 $3' - N_1 - 5'$ 和 $3' - N_2 - 5'$ 或任选地 $3' - N_3 N_1 - 5'$ 和 $3' - N_3 N_2 - 5'$ 或 $3' - N_3 N_4 N_1 - 5'$ 和 $3' - N_3 N_4 N_2 - 5'$ 和任选地具有序列 $3' - N_3 N_4 N_3 N_1 - 5'$ 和 $3' - N_3 N_4 N_3 N_2 - 5'$ 的突出等等(例如,具有序列 $3' - N_3 N_4 N_3 N_4 N_1 - 5'$ 和 $3' - N_3 N_4 N_3 N_4 N_2 - 5'$ 和随后 $3' - N_3 N_4 N_3 N_4 N_3 N_1 - 5'$ 和 $3' - N_3 N_4 N_3 N_4 N_3 N_2 - 5'$ 的突出)。

[0120] 如本文所使用,术语“交替延伸物”是指彼此交替(即,一种延伸物(例如一串T)占据奇数位置而另一种延伸物(例如一串A)占据偶数位置)的两种核苷酸延伸物,其中一种“延伸物”是具有例如至多10个相同核苷酸(例如G、A、T或C)的连续序列,以及第二种延伸物是具有例如至多10个不同核苷酸的连续序列。

[0121] 如本文所使用,术语“不完全核苷酸混合物”包含含有选自G、A、T和C的一种、两种或三种核苷酸(但非所有四种核苷酸)的核苷酸混合物。这些核苷酸可以经过标记或未标记。

[0122] 如本文所使用,术语“可逆终止子”是指当通过DNA聚合酶并入生长中的DNA链时阻断碱基的进一步并入的化学修饰型核苷酸碱基。此类“可逆终止子”碱基和DNA链可以通过化学处理加以脱保护,并且在此类脱保护后,DNA链可以通过DNA聚合酶加以进一步延伸。

[0123] 如本文所使用,术语“荧光标记可逆终止子”是指被荧光团标记的“可逆终止子”碱基,标记方式为经由可以通过用于脱保护以此碱基结束的DNA链的相同处理而裂解的接头。脱保护“荧光标记可逆终止子”同时激活DNA链以供进一步延伸以及从其移除荧光标记。

[0124] 为方便描述,本文所述的许多序列以 $3'$ 到 $5'$ 方向书写。虽然DNA序列通常以 $5'$ 到 $3'$ 方向描述,但为方便描述,下文中的某些DNA序列以 $3'$ 到 $5'$ 方向描述。在各此类情况下,方向性是专门带注释的。

[0125] 术语的其它定义可以出现于说明书通篇中。

[0126] 详述

[0127] 在一些实施方案中,所述方法包括使用与平面样品中的互补位点特异性结合的捕获剂产生标记平面样品(例如,安装在平面(例如显微镜载玻片)上的FFPE切片)。用于使抗体和/或核酸与平面样品中的位点结合的方法是众所周知的。在这些实施方案中,所述标记样品中的捕获剂与包含第一链和第二链的双链核酸(例如杂交在一起的两条寡核苷酸或与寡核苷酸杂交的RCA产物)连接并且所述捕获剂是通过所述双链核酸的第一链(例如,通过 $5'$ 端、 $3'$ 端或其间的任何位置)与所述双链核酸连接(共价或经由生物素非共价),以及一条链的 $3'$ 端或 $5'$ 端(例如,第一链的 $3'$ 端、第二链中的任一 $3'$ 端、第一链的 $5'$ 端或第二链中的任一 $5'$ 端)可以使用另一链作为模板来延伸。在一些情况下,第一链的 $3'$ 端可以相对于第二链的 $5'$ 端凹进,从而界定突出。在其它情况下,第一链的 $5'$ 端可以相对于第二链的 $3'$ 端凹进,从而界定突出。在许多实施方案中,所述捕获剂与平面样品交联,从而阻止所述捕获剂在后续步骤期间解离。这个交联步骤可以使用任何胺对胺交联剂(amine-to-amine crosslinker)(例如,甲醛、disuccinimidyllutarate或具有相似作用的另一试剂)来完成,然而如果需要的话,可以使用各种其它化学品以使所述捕获剂与所述平面样品交联。所述方法包括读取通过将核苷酸或短寡核苷酸(例如,具有2-10个碱基)添加到一条链的可延伸末端(例如, $3'$ 端)所产生的荧光信号。这个步骤可以通过以下步骤来完成:使所述平面样品与聚合酶和核苷酸混合物、连接酶和标记寡核苷酸、或两者的组合接触,从而将一个或多个

核苷酸和/或标记寡核苷酸添加到可延伸末端;以及读取通过将所述一个或多个核苷酸或寡核苷酸添加到所述可延伸末端所产生的荧光信号。

[0128] 如下文即将更详细描述,所述荧光信号可以通过各种不同方法来产生。例如,在一些实施方案中,所述荧光信号可以为来自添加到引物末端的荧光核苷酸的荧光,或源自添加到引物末端的荧光核苷酸的FRET(荧光共振能量转移)信号。在其它实施方案中,所述信号可以通过从荧光标记寡核苷酸移除也与寡核苷酸杂交的淬灭剂来产生。

[0129] 在所述方法的任何实施方式中,所述读取步骤可以后接灭活读取后的荧光,使得可以检测和读取其它结合事件。在这些实施方案中,所述荧光可以通过例如基于过氧化物的漂白、经由可裂解接头与核苷酸连接的荧光团的裂解(例如,使用TCEP作为裂解试剂)、通过exo+聚合酶(例如Vent)进行的碱基交换或后续并入淬灭剂来灭活。

[0130] 同样地,如下文即将更详细描述,所述方法可以以下方式多重:单个平面样品可以通过多种不同捕获剂加以询问,其中各抗体与不同寡核苷酸(即,具有不同序列的寡核苷酸)连接。在多重实施方案中,所述平面样品可以使用至少5、至少10、至少20、至少30、至少50或至少100、至多150或更多种各与不同寡核苷酸连接的捕获剂加以标记,并且所述捕获剂的结合可以使用配备用于各荧光团的适宜滤波器的荧光显微镜分开读取或通过使用用于观察多个荧光团的双或三带通滤波器组来读取。参见例如美国专利第5,776,688号。如下文提到,与捕获剂连接的寡核苷酸可以充当用于挂锁探针的夹板以及充当引物以引发滚环扩增。

[0131] 在所述方法的一些实施方案中所使用的捕获剂可以与含有5'突出(即,可以通过聚合酶或连接酶延伸的凹进3'端)或3'突出(即,可以通过连接酶延伸的凹进5'端)的双链寡核苷酸连接。此类捕获剂的一个实例显示于图1和2中。在图1B中所示的实例中,所述突出是单核苷酸突出(例如,A),然而更长突出(例如,至少2、至少3、至少4、至少5、至少6、至少8、至少10、至少20或至少30个核苷酸)可以适用于其它应用(例如,多重应用)。如图5A-D中所示,在某些情况下,所述突出可以含有重复序列,例如具有2、3、4、5或6核苷酸的相同序列的2、3、4、5或6或更多个重复,从而允许捕获剂用于下文所述的多重应用中。在某些实施方案中,所述双链寡核苷酸可以在所述寡核苷酸的另一端(即,在离所述捕获剂最近的末端)具有凹进3'端。然而,这个末端可以经过设计以致力于不可延伸。在某些情况下,所述双链寡核苷酸可以含有一个或多个与所述突出杂交的第三寡核苷酸。在这些实施方案中,在所述双链寡核苷酸的第二链和与所述突出杂交的寡核苷酸之间将存在具有1、2、3、4或5或更多个核苷酸的空位(参见例如图7和8)。在多重实施方案中,所述多种捕获剂可以通过突出的序列来区分而不是通过所述双链寡核苷酸的第一链的序列来区分。在这些实施方案中,所述双链寡核苷酸的第二链对于每种捕获剂而言是不同的。如其它图中所示,所述方法还可以使用与引物连接的捕获剂来实施,所述引物充当用于环化挂锁探针的夹板以及用于通过滚环扩增引发环化的挂锁探针的扩增。在这些实施方案中,标记样品中的捕获剂可以与滚环扩增产物连接。

[0132] 在某些情况下,所使用的荧光团可以为香豆素、青色素、苯并呋喃、喹啉、喹啉酮、吲哚、苯并唑、硼聚氮杂引达省(borapolyazaindacene)和或氧杂蒽(包括荧光素、罗丹明和rhodol)。在多重实施方案中,荧光团可以经过选择使得它们可以彼此区分,即独立可检测,这意指这些标记可以独立地被检测和测量,甚至当这些标记混合时亦如此。换句话

说,对于各标记,存在的标记数量(例如,荧光数量)是单独可确定的,甚至当这些标记共同位于(例如,相同试管或切片的相同区域中)时亦如此。

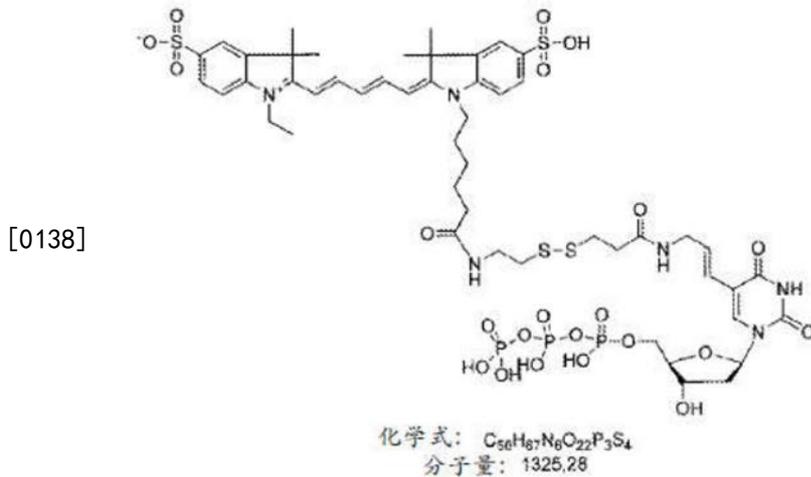
[0133] 感兴趣特定荧光染料包括:氧杂葱染料,例如荧光素和罗丹明染料,例如异硫氰酸荧光素(FITC)、6-羧基荧光素(常见缩写FAM和F)、6-羧基-2',4',7',4,7-六氯荧光素(HEX)、6-羧基-4',5'-二氯-2',7'-二甲氧基荧光素(JOE或J)、N,N,N',N'-四甲基-6-羧基罗丹明(TAMRA或T)、6-羧基-X-罗丹明(ROX或R)、5-羧基罗丹明-6G(R6G⁵或G⁵)、6-羧基罗丹明-6G(R6G⁶或G⁶)和罗丹明110;青色素染料,例如,Cy3、Cy5和Cy7染料;香豆素,例如,伞形酮;苯甲酰亚胺染料,例如,赫斯特33258(Hoechst 33258);吡啶染料,例如,德克萨斯红(Texas Red);溴化乙锭染料;吡啶染料;吡啶染料;吩噻嗪染料;吡啶染料;聚甲炔染料,例如,BODIPY染料和喹啉染料。本申请中常用的感兴趣特定荧光团包括:苾、香豆素、二乙基氨基香豆素、FAM、荧光素氯均三嗪、荧光素、R110、伊红、JOE、R6G、四甲基罗丹明、TAMRA、丽丝胺(Lissamine)、萘氧基荧光素(Naphthofluorescein)、德克萨斯红、Cy3和Cy5等。

[0134] 适用于本方法中的适宜可区分荧光标记包括Cy-3和Cy-5(Amersham Inc., Piscataway, NJ)、Quasar 570和Quasar 670(Biosearch Technology, Novato CA)、Alexafluor555和Alexafluor647(Molecular Probes, Eugene, OR)、BODIPY V-1002和BODIPY V1005(Molecular Probes, Eugene, OR)、POPO-3和TOTO-3(Molecular Probes, Eugene, OR)和POPR03和TOPR03(Molecular Probes, Eugene, OR)。其它适宜可区分可检测标记可以参见Kricka等人(Ann Clin Biochem. 39:114-29, 2002); Ried等人(Proc. Natl. Acad. Sci. 1992:89:1388-1392)和Tanke等人(Eur. J. Hum. Genet. 1999 7:2-11)和其它文献。

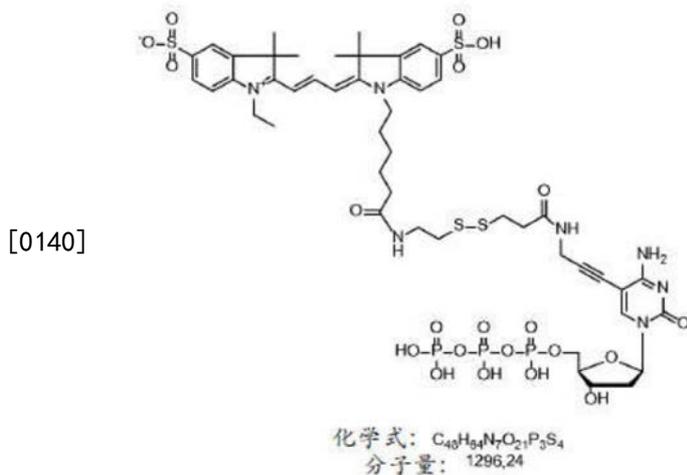
[0135] 除了上述标记方法以外,所述样品可以在进行上述方法之前或之后使用细胞学染色剂进行染色。在这些实施方案中,所述染色剂可以为例如毒伞素、扎双胺、吡啶橙、俾斯麦棕(bismarck brown)、barmine、考马斯蓝、bresyl紫、brystal紫、DAPI、苏木精、伊红、溴化乙锭、酸性品红、苏木精、赫斯特染色剂、碘、孔雀绿、甲基绿、亚甲基蓝、中性红、尼罗蓝(Nile blue)、尼罗红、四氧化锇(osmium tetroxide)(正式名称:四氧化锇(osmium tetraoxide))、罗丹明、番红精、磷钨酸、四氧化锇、四氧化钨、钼酸铵、碘化钼、碳酰肼、氯化铁、六胺、三氯化铟、硝酸镧、乙酸铅、柠檬酸铅、硝酸铅(II)、高碘酸、磷钼酸、铁氰化钾、亚铁氰化钾、钨红、硝酸银、蛋白银、氯金酸钠、硝酸铈、氨基硫脲、乙酸铈酰、硝酸铈酰、硫酸氧钒或其任何衍生物。所述染色剂可以特异于任何感兴趣特征,例如蛋白质或蛋白质类别、磷脂、DNA(例如,dsDNA、ssDNA)、RNA、细胞器(例如,细胞膜、线粒体、内质网、高尔基体、核被膜等等)、细胞隔室(例如,胞液、核部分等等)。所述染色剂可以增强细胞内或细胞外结构的对比度或成像。在这些实施方案中,所述样品可以使用苏木精和伊红(H&E)进行染色。

[0136] 下文显示可用于本发明中的示意性巯基可裂解脱氧核苷酸类似物的结构。应当认识到,这些核苷酸仅为示意性并且其它核苷酸(包括可通过其它刺激物裂解的核苷酸(例如光可裂解核苷酸))可用于本发明方法中。

[0137] dUTP-SS-Cy5:



[0139] dCTP-SS-Cy3



[0141] 为进一步阐述本发明,给出以下特定实施例,应了解这些实施例提供用于阐述本发明并且不应理解为以任何方式限制其范围。

[0142] 实施方式I

[0143] 在这个实施例中,所述荧光信号可以通过添加到(即,通过聚合酶添加或(如果荧光核苷酸位于寡核苷酸中)连接到)引物的3'端的荧光核苷酸来产生。这种方法可以包括读取来自所添加的荧光核苷酸的信号,或读取由添加到引物的两个核苷酸之间的能量转移所产生的FRET信号。

[0144] 图1和2中所示的实例显示抗体如何以化学方式或经由生物素/链霉亲和素相互作用(图1B)与寡核苷酸连接以及如何通过将荧光核苷酸添加到引物的末端来产生荧光信号(图2)。在这个实例中,所述抗原是通过与具有突出5'端(下链)和凹进3'端(上链)的DNA二聚体偶联的抗体以化学方式(图1顶部图)或经由链霉亲和素(图1底部图和中间图)来染色。

[0145] 在所述捕获剂与所述组织样品结合后,所述捕获剂的结合的图案可以通过使用适宜聚合酶(例如,通过exo⁻Klenow、Bst、Taq、Klentaq或exo⁻Klenow-Vent混合物)和荧光标记核苷酸(图1和图2顶部图)使用载玻片上末端补平(fill-in)反应加以确定。

[0146] 如果需要的话,信噪比可以通过以下方式增加:a)使与标记核苷酸互补的位置多聚化(图2,中间图);或b)产生并入的两个核苷酸之间的FRET,从而一个核苷酸(图2,图中底部图C)的发射波长充当另一个核苷酸(图2,图中底部图U)的激发波长。

[0147] 荧光可以在添加后续染色试剂之前通过任何简便方法(包括但不限于光漂白、基于过氧化物的漂白、通过臭氧灭活、经由可裂解接头与核苷酸连接的荧光团的裂解(例如,使用TCEP作为裂解试剂)、通过exo+聚合酶(例如Vent)进行碱基交换、后续并入淬灭剂)来灭活。

[0148] 在这些实施方案中,在已经灭活荧光后,可以重复所述方法,即,所述平面样品可以使用不同抗体加以再染色并且可以读取荧光。

[0149] 多重

[0150] 多重可以使用特殊设计的寡核苷酸使用两种不同方法(称作“可逆终止子”和“缺失碱基”方法,其将更详细描述于下文中)加以实施。这些方法都是依赖于包含多种(例如,至少5、至少10、至少20、至少30、至少50或至少100、至多150或更多种)识别不同互补位点的捕获剂的组合物,其中:每种捕获剂与包含第一链和第二链的双链核酸(例如,寡核苷酸)连接;所述捕获剂是通过第一链的(例如5'端)与双链核酸连接;各双链核酸中的一条链的3'端可以使用另一链作为模板来延伸,其中所述模板对于每种捕获剂而言是不同的。此类组合物的实例阐述与图3和4中,其中模板是突出。图3和4中所示的一般原理可以扩延到包含RCA产物的双链核酸。图3显示一群具有由下式定义的模板(例如,突出)的捕获剂: $3' - N_{4n}N_1/N_2/N_3 - 5'$,在5'端后接具有随机组成的短延伸物以增加DNA双链体上的总体聚合酶驻留,其中 N_1 、 N_2 、 N_3 和 N_4 是选自G、A、T和C的不同核苷酸并且n是0、1或以上。图4(另一方面)显示一群具有由下式定义的突出的捕获剂: $3' - YN_1/N_2 - 5'$,任选地在5'端后接具有随机核苷酸的短延伸物(例如,1-5个残基)以增加DNA双链体上的总体聚合酶驻留,其中Y是由碱基 N_3 和 N_4 构成的长度为n(n为0、1或以上)的核苷酸序列,其中核苷酸 N_3 是在奇数位置而核苷酸 N_4 是在偶数位置,从突出的起点计数并且 N_1 、 N_2 、 N_3 和 N_4 是选自G、A、T和C的不同核苷酸。如图3、4和5中所示,第一链的序列对于每种捕获剂而言是相同的;而第二链的序列对于每种捕获剂而言是不同的。在这些实施方案中,所述不同第二链使得突出在不同捕获剂之间不同。

[0151] 在一些实施方案中,所述多重方法可以大致上包括:(a)用上述抗体组合物培养平面样品,培养条件为使所述捕获剂结合至所述平面样品中的互补位点;(b)使所述捕获剂与所述平面样品交联;(c)使所述平面样品与聚合酶和标记和未标记核苷酸的不完全核苷酸混合物或其中一些或全部核苷酸是荧光核苷酸并且一些或全部核苷酸是可逆终止子核苷酸或荧光可逆终止子核苷酸的核苷酸混合物接触,以及任选地,使所述平面样品与标记和未标记寡核苷酸的混合物和DNA连接酶接触,DNA连接酶将短标记寡核苷酸与寡核苷酸双链体(其与特定捕获剂附接)的3'端共价附接。在这些实施方案中,寡核苷酸只添加到其中突出与所述寡核苷酸互补的双链体上。这种方法进一步包括(d)使用荧光显微法,读取通过将核苷酸添加到一些但非全部的捕获剂所产生的荧光信号。信号配准后,这种方法可以包括(e)若使用可逆终止子途径,那么通过化学或光裂解标记核苷酸来移除荧光信号,接着脱保护寡核苷酸的3'端,实现添加其它核苷酸和/或寡核苷酸。这种方法的步骤(c)可以包括(c)使平面样品与聚合酶和以下各项接触:(i)包含与 N_1 、 N_2 和 N_3 互补的荧光核苷酸和与 N_4 互补的可逆终止子核苷酸的核苷酸混合物;或(ii)包含与 N_1 、 N_2 和 N_3 互补的荧光可逆终止子核苷酸和与 N_4 互补的可逆终止子核苷酸的核苷酸混合物;或(iii)包含与 N_1 和 N_2 互补的荧光核苷酸、与 N_3 互补的未标记核苷酸而不含与 N_4 互补的核苷酸的核苷酸混合物,从而将荧光核苷酸添加到一些但非全部的捕获剂的双链寡核苷酸上,从而将荧光核苷酸添加到一些但非全部

的捕获剂的双链寡核苷酸上；以及(d)使用荧光显微法，读取通过将荧光核苷酸添加到一些但非全部的捕获剂中所产生的荧光信号。步骤(c)还可以通过使用连接酶将标记寡核苷酸添加到双链体上来实施。此类方法的实施例更详细地描述于下文中。

[0152] 参考图6，预期在当欲采用更大组的捕获剂(100或更多种)的情况下，整个寡核苷酸突出上的读段长度可以相应地增加。这样可能会或可能不会降低染色效率，因为引物延伸错误沿着寡核苷酸双链体的长度而积累。为了规避信号损失的此类潜在来源，可以稍微修改设计。多种捕获剂可以分成多组，使得组中的捕获剂数量不超过多重方案的容量以呈现染色而无显著信号损失(例如30种)。各此类组的捕获剂将与具有与“缺失碱基”途径的原始版本中相同的序列的“终止”(最后的3' 碱基经二脱氧或丙基修饰)上链寡核苷酸缀合。下链寡核苷酸将并入额外组特异性区域，其将充当额外引物的附着位点，所述额外引物用来在欲呈现特定子组的总计多种抗体时与所述特定子组的总计多种抗体进行载玻片上杂交。这种方法不会让读段延伸超过某个临界值并且同时在所述样品中具有无限潜在数量的捕获剂。

[0153] 可逆终止子方法

[0154] 所述方法的这种实施方式依赖于可逆终止子(即，链终止子核苷酸，其可以在并入后脱保护，从而允许将其它核苷酸添加到这个核苷酸上)。

[0155] 这种方法可以使用包含多种与双链核酸(例如，寡核苷酸)连接的捕获剂的组合物来实施，如图3中所示。在这些实施方案中，所述双链核酸的顶链与捕获剂连接并且对于各抗体而言可以是相同的，底链的序列随捕获剂不同而变化。如图5A中所示，所述双链核酸的下链的5'端(其可以形成突出)可以具有通式 $3' - N_{4n}N_1/N_2/N_3 - 5'$ ，5'端后接具有随机核苷酸的短延伸物以增加DNA双链体上的总体聚合酶驻留，其中 N_1 、 N_2 、 N_3 和 N_4 是选自G、A、T和C的不同核苷酸并且n是0、1或以上。如图5B中所示，更一般式的下链寡核苷酸突出 $3' - XN_1/N_2/N_3 - 5'$ ，其中 N_1 、 N_2 、 N_3 是选自G、A、T和C的不同核苷酸并且X为具有随机组成和长度的具有碱基Xi(使得Xi为选自G、A、T和C的不同核苷酸)的核苷酸延伸物也适用于这种方法中。

[0156] 在一些实施方案中，这种方法可以包括：(a)用多重抗体组合物(其中突出具有式 $5' - N_1/N_2/N_3N_{4n}$ ，其中 N_1 、 N_2 、 N_3 和 N_4 是选自G、A、T和C的不同核苷酸并且n是1或以上)培养平面样品，培养条件为使所述捕获剂与所述平面样品中的互补位点特异性结合；(b)使所述捕获剂与所述平面样品交联；(c)使所述平面样品与聚合酶和核苷酸混合物(其包含与 N_1 、 N_2 和 N_3 互补的荧光核苷酸和与 N_4 互补的可逆终止子核苷酸)接触，和/或连接包含标记核苷酸的寡核苷酸；以及(d)使用荧光显微法，读取通过将核苷酸添加到一些但非全部的捕获剂中所产生的荧光信号。这个循环可以通过以下步骤来重复：(e)灭活荧光信号，脱保护可逆终止子核苷酸以及(f)阻断平面样品；以及重复步骤(c)和(d)。在某些实施方案中，所述方法可以包括重复步骤(c)、(d)、(e)和(f)多次。用于阻断的试剂可以取决于所用化学品不同而变化。在某些实施方案中，所述样品可以使用硫醇反应性化合物(例如半胱氨酸、谷胱甘肽或碘乙酰胺)加以阻断。

[0157] 例如，这种方法可以使用包含以下各项的组合物来实施：与第一双链寡核苷酸连接的第一抗体，其中所述第一双链寡核苷酸包含含有碱基 N_1 的单核苷酸5'突出；与第二双链寡核苷酸连接的第二抗体，其中所述第二双链寡核苷酸包含含有碱基 N_2 的单核苷酸5'突出；与第三双链寡核苷酸连接的第三抗体，其中所述第三双链寡核苷酸包含含有碱基 N_3 的

单核苷酸5'突出;与第四双链寡核苷酸连接的第四抗体包含双核苷酸5'突出,其中所述突出的第一位置包含碱基 N_4 而所述突出的第二位置是碱基 N_1 ;与第五双链寡核苷酸连接的第五抗体,其中所述第五双链寡核苷酸包含双核苷酸5'突出,其中所述突出的第一位置包含碱基 N_4 而所述突出的第二位置是碱基 N_2 ;以及与第六双链寡核苷酸连接的第六抗体,其中所述第六双链寡核苷酸包含双核苷酸5'突出,其中所述突出的第一位置包含碱基 N_4 而所述突出的第二位置是碱基 N_3 ,其中 N_1 、 N_2 、 N_3 和 N_4 是选自G、A、T和C的不同核苷酸。此类捕获剂群体的实例显示于图3中。

[0158] 在RCA实施方案中,与所述抗体连接的链对于各抗体而言可以不同的,其中RCA产物在所述RCA产物的各重复中含有符合上式的序列。

[0159] 在某些实施方案中,所述组合物还可以含有与第七双链寡核苷酸连接的第七抗体,其中所述第七双链寡核苷酸包含多核苷酸5'突出,其中所述突出的第一位置包含碱基 N_4 ,所述突出的第二位置是碱基 N_4 以及第三位置是选自 N_1 、 N_2 和 N_3 。相同原理可以适用于具有多于7个位置(例如,9、10、11、至多20、30或40或以上)的突出。

[0160] 在所述方法的这种实施方式中,所述平面样品可以使用一组捕获剂同时共染色,每种捕获剂使用一种根据图3中概述的策略设计的寡核苷酸双链体加以标记。所述双链体是以使得每个抗体具有经由5'端以共价方式或经由链霉亲和素与抗体连接的相同上链序列的方式加以设计。下链随抗体不同而变化。在这种实施方式中,下链的通式是与上链 $G_n A/T/C-5'$ 互补的 $3'$ -二脱氧dC-序列。保留一种类型的下链碱基(在这个实施例中为核苷酸G)以供步进式行进以及上链中的其互补对从不以标记形式使用。其它三种碱基与标记核苷酸互补并且每个循环可以用于识别三种捕获剂。在更一般情况下,下链的通式是与上链 $X-N_1/N_2/N_3-5'$ 互补的 $3'$ -二脱氧dC-序列,其中X的 X_1 是任何核苷酸(被保留用于这个特定循环的“行走碱基”的核苷酸除外)以及X是图5B中所示的任何碱基。这种设计确保:a)没有两种抗体含有相同双链体和b)每次只能检测三种不同捕获剂。每个循环包括:(a)标记步骤,其中标记三种捕获剂以及使剩下的双链体每次延伸一个碱基,(b)成像步骤以及(c)脱色/脱保护步骤。在循环过渡期间,来自先前循环的所添加的荧光标记通过任何适宜方法加以灭活,包括但不限于从核苷酸裂解掉荧光团(如果标记核苷酸是经由可裂解接头与荧光团连接);基于过氧化物的漂白;光漂白;化学辅助型光漂白;通过exo+聚合酶进行的标记碱基置换等。灭活先前反应中所添加的荧光团后或同时,通过从已经添加到捕获剂的剩余部分中的未标记“延伸”核苷酸的 $3'$ 端裂解掉保护基团来激活所述未标记“延伸”核苷酸。保护基团的裂解进一步允许核苷酸在下一循环中延伸。由于A、T和C被保留用于并入标记核苷酸,因此这些核苷酸只出现在双链体的各下链的末端。这种方法是基于可逆终止子的化学性质,其阻止每次上链延伸多于一个核苷酸,甚至在下链的polyG延伸物上亦如此。任选地,可以在标记核苷酸之后并入淬灭剂标记核苷酸。图13A-D显示小鼠脾脏细胞涂片中的CD4和CD8阳性T细胞的序列检测中所举例的“可逆终止子方法”的表现。

[0161] 缺失碱基方法

[0162] 所述方法的这种实施方式依赖于“缺失”碱基设计,其中在每个循环中,将两种标记核苷酸和一种未标记核苷酸添加到反应中,而“缺失碱基”阻止引物延伸超过单个核苷酸。

[0163] 这种方法可以使用包含多种与双链核酸连接的捕获剂的组合物来实施,如图4中

所示。在这些实施方案中,所述双链核酸的顶链与所述捕获剂连接并且对于每个抗体而言可以是相同的,而底链的序列随捕获剂不同而变化。如图4中所示,所述双链寡核苷酸的下链的5'端(其形成突出)可以具有通式 $3' -YN_1/N_2 -5'$,任选地在5'端后接具有随机核苷酸的短延伸物(例如,1-5个残基)以增加DNA双链体上的总体聚合酶驻留,其中Y是由碱基 N_3 和 N_4 构成的长度为n(n为0、1或以上)的核苷酸序列,其中核苷酸 N_3 是在奇数位置而核苷酸 N_4 是在偶数位置,从突出的起点计数并且 N_1 、 N_2 、 N_3 和 N_4 是选自G、A、T和C的不同核苷酸。

[0164] 更一般式 $3' -YN_1/N_2 -5'$ 也适用于这种方法中,其中 N_1 、 N_2 、 N_3 和 N_4 是选自G、A、T和C的不同核苷酸并且Y是长度为n(n为0、1或以上)的核苷酸序列,其由交替随机长度延伸的碱基 N_3 和 N_4 构成,使得 N_3 延伸物的序号是奇数而 N_4 延伸物的序号是偶数。

[0165] 在某些实施方案中,这种方法可以包含:(a)用多重抗体组合物(其中突出具有先前段落中所述的式($3' -YN_1/N_2 -5'$))培养平面样品,培养条件为使所述捕获剂与所述平面样品中的互补位点特异性结合;(b)使所述捕获剂与所述平面样品交联;(c)使所述平面样品与聚合酶和核苷酸混合物(其包含与 N_1 和 N_2 互补的荧光核苷酸和与 N_3 互补的未标记核苷酸而不含与 N_4 互补的核苷酸)接触,和/或连接具有标记核苷酸的寡核苷酸;以及(d)使用荧光显微法,读取通过将核苷酸添加到一些但非全部的捕获剂中所产生的荧光信号。这个循环可以通过以下步骤来重复:(e)灭活荧光信号;(f)阻断样品并且使所述平面样品与聚合酶和与 N_4 互补的未标记核苷酸接触和/或使样品与标记寡核苷酸和连接酶接触;以及重复步骤(c)(d)来重复。在某些实施方案中,所述方法可以包括重复步骤(c)、(d)、(e)和(f)多次。

[0166] 这种方法可以使用包含以下各项的捕获剂组合物来实施:与第一双链寡核苷酸连接的第一抗体,其中所述第一双链寡核苷酸包含含有碱基 N_1 的单核苷酸5'突出;与第二双链寡核苷酸连接的第二抗体,其中所述第二双链寡核苷酸包含含有碱基 N_2 的单核苷酸5'突出;与第四双链寡核苷酸连接的第三抗体,其中所述第三双链寡核苷酸包含双核苷酸5'突出,其中所述突出的3'位置的第一位置包含碱基 N_4 而第二位置包含碱基 N_1 ;以及与第四双链寡核苷酸连接的第四抗体,其中所述第四双链寡核苷酸包含双核苷酸5'突出,其中所述突出的第一位置包含碱基 N_4 而第二位置包含碱基 N_2 ,其中 N_1 、 N_2 、 N_3 和 N_4 是选自G、A、T和C的不同核苷酸。此类捕获剂群体的实例显示于图4中。

[0167] 在某些实施方式中,所述组合物还可以含有与第五双链寡核苷酸连接的第五抗体,其中所述第五双链寡核苷酸包含多核苷酸5'突出,其中所述突出的第一位置包含碱基 N_4 ,第二位置是碱基 N_3 以及第三位置是选自 N_1 或 N_2 。

[0168] 总体来说,在“可逆终止子”和“缺失碱基”方法的情况下,均不存在对共检测互补位点(例如抗原)的数量的理论限制。

[0169] 缺失碱基方法不使用可逆终止子。相反,单碱基的延伸是通过使用两种交换碱基(例如,如图4中所示的T和C代替“可逆终止子”方法中的相应G)和每次将两种dNTP中的仅一个添加到引物延伸反应中加以确保。在并入第一核苷酸之后,第二dNTP的缺乏导致链伸长停止,从而确保引物仅延伸单个核苷酸。与先前策略一样,所有互补位点可以使用捕获剂同时共染色,每种捕获剂用特异性寡核苷酸双链体标记。

[0170] 在这种实施方案中,所述双链体可以使用图4中所示的策略(即,以使得各抗体具有经由共价键或经由链霉素和素-生物素相互作用与其连接的相同上链寡核苷酸序列的方式)加以设计。在这种实施方式中,下链随抗体不同而变化。在这种方法中,下链的通式是与

上链YA/N₂-5'互补的3' ddC序列,其中Y是由碱基T和C组成,使得发现T仅在偶数位置而C仅在奇数位置。或在更一般情况3'-YN₁/N₂-5'中,其中N₁、N₂、N₃和N₄是选自G、A、T和C的不同核苷酸且Y是由交替随机长度延伸的碱基N₃和N₄构成的长度为n(n为0、1或以上)的核苷酸序列,使得N₃延伸物的序号是奇数而N₄延伸物的序号是偶数。在第一简单实施方式中,保留下链的两种碱基对(图4的示意性设计中为T和C)以供步进式行进以及上链中的其互补对从不标记。另外两种碱基与标记核苷酸互补并且每个循环可以呈现两种不同捕获剂的染色。此类设计确保a)没有两种捕获剂含有相同双链体和b)每个循环只读取两种不同抗体。在这种实施方式中,每个循环可以具有三个步骤:标记步骤,其中两种捕获剂是通过并入荧光dNTP加以标记并且所有其它双链体每次延伸一个碱基;成像步骤;以及脱色/再激活步骤。

[0171] 在RCA实施方案中,与抗体连接的链对于每个抗体而言可以不同的,其中RCA产物在所述RCA产物的各重复中含有符合上式的序列。

[0172] 在循环过渡期间,来自先前循环的标记捕获剂可以用上述相同方式加以漂白/脱色。任选地,可以在标记碱基之后并入淬灭剂标记核苷酸来代替漂白。因为在这个实施方案中标记的位置是突出中的最后位置,所以来自先前循环的标记捕获剂无法在稍后循环中再标记,因为突出中的所有核苷酸位置已经被补平。图13、15和图16显示小鼠脾脏细胞涂片中的CD4和CD8阳性T细胞的序列检测中所举例的“可逆终止子方法”的表现。

[0173] 实施方式II

[0174] 在这种方法中,通过切口平移进行的引物延伸会从荧光标记“检测”寡核苷酸移除淬灭剂,荧光标记“检测”寡核苷酸是以使得定位于上游引物下游的方式与下链寡核苷酸杂交。这种方法的原理显示于图7中。这种方法的多重版本显示于图8中。

[0175] 在某些实施方案中,所述多重实施方式可以包括:(a)用多种与双链寡核苷酸连接的捕获剂培养平面样品;(b)使所述捕获剂与所述平面样品交联;(c)例如通过添加核苷酸使用聚合酶或通过添加寡核苷酸使用连接酶延伸与多种捕获剂中的第一组捕获剂的寡核苷酸杂交的引物,从而产生第一组荧光信号(例如,通过从与位于引物下游的寡核苷酸杂交的标记寡核苷酸移除淬灭剂);(d)使用荧光显微法读取第一组荧光信号;(e)灭活荧光;(f)延伸与多种捕获剂中的第二组捕获剂的寡核苷酸杂交的引物,从而产生第二组荧光信号(例如,通过从与位于引物下游的寡核苷酸杂交的标记寡核苷酸移除淬灭剂);(g)使用荧光显微法读取第二组荧光信号;以及(h)比较步骤(d)和(g)中所产生的图像。

[0176] 在这种方法中,与捕获剂连接的双链寡核苷酸的构造具有特定设计,其有效实现通过“切口平移”呈现捕获剂结合图案。具体来说,使上链和下链寡核苷酸的双链体(其中下链具有长5'突出)与通过荧光和淬灭剂标记的小侦测寡核苷酸进一步杂交。在初始上链与上链检测寡核苷酸之间存在预设计空位。在循环染色期间,这个空位是通过“可逆终止子”或“缺失碱基”进行“行走”(与先前部分中描述类似),直到将所述空位缩小到单碱基切口。通过“切口平移”聚合酶(例如DNA聚合酶I)在上链中延伸和行进通过切口会从一些但非全部的淬灭荧光标记寡核苷酸移除淬灭剂,从而产生一些但非全部的捕获剂的荧光信号。

[0177] 在一些实施方案中,所述方法大致上包括:(i)用以下各项标记平面样品:i.第一抗体,其中第一抗体与第一寡核苷酸双链体连接,第一寡核苷酸双链体包含下链寡核苷酸以及与其杂交的独特序列:(i)寡核苷酸上链“引物”和(ii)标记上链寡核苷酸,其包含位于所述引物下游的位点的5'淬灭剂;和位于所述淬灭剂下游的荧光团;以及ii.第二抗体,其

中第二抗体与第二寡核苷酸双链体连接,第二寡核苷酸双链体包含下链寡核苷酸以及与其杂交的独特序列:(i)寡核苷酸上链“引物”和(ii)由荧光团和淬灭剂标记的上链寡核苷酸;其中所述引物的3'端与标记寡核苷酸的5'端之间的空位对于第一和第二寡核苷酸而言是不同的;(ii)用第一核苷酸混合物和聚合酶培养组织样品,从而只从与第一寡核苷酸杂交的标记寡核苷酸移除淬灭剂并且产生第一荧光信号;(iii)使用荧光显微法读取第一荧光信号;(iv)通过切口平移聚合酶的进一步行进灭活荧光信号;(v)用第二核苷酸混合物和聚合酶培养组织样品,从而只从与第二寡核苷酸杂交的标记寡核苷酸移除淬灭剂并且产生第一荧光信号;以及(vi)使用荧光显微法读取来自平面样品的第二荧光信号。

[0178] 图7和8显示这种方法的实施例。图8中所示的多重方法具有以下步骤:

[0179] 步骤1:通过捕获剂染色平面样品,捕获剂是以化学方式或经由链霉亲和素与DNA双链寡核苷酸偶联(如图1中所述),使得双链体的顶链含有切口或单碱基缺失,后接两端以荧光团和其淬灭剂为边界的核苷酸延伸物(“分子信标”或基于Taqman的设计)。

[0180] 步骤2:通过由任何5' exo+聚合酶(例如DnaPolI Klenow片段)在单字母(例如图5中的A)的存在下进行的切口平移反应来呈现染色图案。切口平移移除淬灭剂但在移除双链体的具有荧光团的部分之前停止。

[0181] 步骤3:为了呈现其它染色试剂,通过在携带荧光团的延伸物的字母的存在下连续切口平移来移除荧光。

[0182] 步骤4:当需要多重时,可以通过与检测试剂附接的寡核苷酸双链体的特殊设计来实现多重。具体来说,各抗体组(每个循环两组或三组)在顶链引发与检测寡核苷酸之间具有渐增长度的空位。携带淬灭剂/荧光团对的链上的这种序列空位是以使得每个循环延伸单个碱基的方式(与方法1中实现的方式类似(参见图8))来补平,一直到最后一个切口。

[0183] 实施方式III

[0184] 在这种实施方式中,所述方法包括通过以荧光标记碱基进行的引物延伸来呈现抗体染色或者另外读取由通过引物延伸添加到引物的第一荧光核苷酸与存在于图10核苷酸中的第二核苷酸之间的能量转移所产生的FRET信号。这种方法的原理显示于图9A中。通过利用解链双链体或利用核酸外切酶移除延伸引发寡核苷酸以及使在不同抗体上可延伸的另一引物寡核苷酸再退火来实现多重。这种方法的多重版本显示于图9B中。在某些实施方案中,多重实施方式可以包括:(a)用多种捕获剂培养平面样品;(b)使所述捕获剂与所述平面样品交联;(c)延伸与多种捕获剂中的第一组捕获剂的寡核苷酸杂交的引物(例如,其中第一引物的3'端仅退火于第一群体寡核苷酸),从而产生第一组荧光信号(这个步骤可以通过添加标记核苷酸使用聚合酶和/或使样品与标记核苷酸和连接酶接触来完成);(d)使用荧光显微法读取第一组荧光信号;(e)灭活荧光;(f)延伸与多种捕获剂中的第二组捕获剂的寡核苷酸杂交的引物(例如,其中第一引物的3'端仅退火于第二群体寡核苷酸),从而产生第二组荧光信号(这个步骤也可以通过添加标记核苷酸使用聚合酶和/或使样品与标记核苷酸和连接酶接触来完成);(g)使用荧光显微法读取第二组荧光信号;以及(h)比较步骤(d)和(g)中所产生的图像。

[0185] 在某些实施方案中,这种方法包括:(a)用(i)与第一标记寡核苷酸连接的第一抗体和(ii)与第二标记寡核苷酸连接的第二抗体培养平面样品;(b)使所述捕获剂与所述平面样品交联;(c)使第一和第二标记寡核苷酸与第一引物杂交,其中第一引物的3'端仅退火

于第一标记寡核苷酸；(d)以荧光核苷酸延伸所述引物(这个步骤可以通过添加标记核苷酸使用聚合酶和/或使样品与标记核苷酸和连接酶接触来完成)；(e)通过荧光显微法读取由第一寡核苷酸的标记与添加到第一引物的荧光核苷酸之间的能量转移所产生的FRET信号；(f)灭活添加到第一引物的荧光核苷酸；(g)使第一或第二标记寡核苷酸与第二引物杂交，其中第二引物的3'端仅退火于第二标记寡核苷酸；(h)以荧光核苷酸延伸第二引物；以及(i)通过荧光显微法读取由第二寡核苷酸的标记与添加到第二引物的荧光核苷酸之间的能量转移所产生的FRET信号。

[0186] 图9-10显示这种方法的实施例。图8-11中所示的方法具有以下步骤：

[0187] 步骤1：使用与单链寡核苷酸偶联的捕获剂染色平面样品。所述寡核苷酸可以未标记或在3'端经FRET受体(例如Cy5)荧光团标记。

[0188] 步骤2：通过互补探针的载玻片上杂交，接着进行引物延伸反应来确定结合图案，在引物延伸反应中，荧光标记核苷酸补平延伸链中的突出。在这个实施例(参见图10)中，延伸碱基是经FRET供体(例如Cy3)标记，FRET供体可以增加信噪比。如果与捕获剂连接的寡核苷酸未标记，那么已通过DNA合成并入的核苷酸的荧光发射可以直接加以检测，而无需FRET图9。

[0189] 步骤3：其它捕获剂的结合图案可以通过利用exo+DNA聚合酶(例如Vent)裂解下链移除荧光来确定(图9)。或者，荧光可以通过将温度提升超过DNA链的熔点或通过先前所述脱色技术中的一种技术加以移除。

[0190] 步骤4：多重可以通过用捕获剂(各经特异性寡核苷酸标记)文库染色样品并且循环上述步骤1-3(每次使用与一种捕获剂缀合寡核苷酸互补的不同检测寡核苷酸)来实现。只有其中使引物特异性退火的双链体将会适当延伸(图11)。在这些实施方案中，各引物是经过设计使得其3'端与和捕获剂连接的寡核苷酸中的仅一个杂交。

[0191] 其它实施方式

[0192] 如图16中示意性显示，信号可以使用滚环扩增而加以扩增。在这些实施方案中，使与寡核苷酸连接的捕获剂与挂锁探针杂交，所述挂锁探针以使得所述挂锁探针的末端为相邻可连接的方式与所述寡核苷酸杂交。在这个实施方案中，在连接后，所述挂锁探针(其现在已环化)可以通过由所述寡核苷酸引发的滚环扩增反应加以拷贝。这个反应产生所述挂锁探针的多连体，其含有若干个(在许多情况下为数百或数千个)串联的与捕获剂连接的具有相同序列的拷贝。所述滚环扩增产物(其与抗体连接)可以使用上述方法加以检测，并且如上所述，信号得到扩增，因为所检测的序列得到重复。在这些实施方案中，所述(i)捕获剂与包含第一链(即，RCA产物)和第二链(包含检测寡核苷酸)的双链核酸连接。单分子可以使用此类方法加以检测。

[0193] 图19显示RNA分子如何可以使用挂锁探针/RCA扩增方法加以检测。在这种方法中，所述挂锁探针与和所述捕获剂相同的mRNA杂交(“夹板引物”)，从而确保所述挂锁探针仅在靶RNA的存在下环化。在这个实施方案中，所述夹板引物与靶RNA杂交，充当挂锁探针的夹板，以及充当滚环扩增的引物，从而允许信号以与图16中类似的方式扩增。

[0194] 图20显示一种替代方法，其依赖于引物延伸和短标记寡核苷酸的连接。在这个实施方案中，短标记寡核苷酸与顶链寡核苷酸的连接仅在突出已经补平到某个点之后出现。在依赖于连接的实施方案中，标记寡核苷酸可以添加到可延伸末端的3'端或5'端。

[0195] 效用

[0196] 本文所述的方法和组合物可以普遍用于各种用于任何平面样品分析的应用中(例如,用于组织切片、细胞层、离心细胞、电泳凝胶印迹、免疫印迹、斑点印迹、ELISA、抗体微阵列、核酸微阵列等的分析中)。

[0197] 在特定实施方案中,所述平面样品可以为从患者获得的组织活检的切片。感兴趣活检包括皮肤(黑色素瘤、癌等)、软组织、骨、乳房、结肠、肝脏、肾脏、肾上腺、胃肠道、胰腺、胆囊、唾液腺、子宫颈、卵巢、子宫、睾丸、前列腺、肺、胸腺、甲状腺、甲状旁腺、垂体(腺瘤等)、大脑、脊髓、眼睛、神经和骨骼肌等的肿瘤和非瘤性活检。

[0198] 在某些实施方案中,捕获剂与可为蛋白质类或核酸的生物标记物(包括癌症标记物)特异性结合。示意性癌症生物标记物包括但不限于癌胚抗原(用于识别腺癌)、细胞角蛋白(用于识别癌但还可以表现于一些肉瘤中)、CD15和CD30(用于识别霍奇金氏病)、 α 胎蛋白(用于识别卵黄囊瘤和肝细胞癌)、CD117(用于识别胃肠道间质瘤)、CD10(用于识别肾细胞癌和急性淋巴细胞白血病)、前列腺特异性抗原(用于识别前列腺癌)、雌激素和孕酮(用于肿瘤识别)、CD20(用于识别B-细胞淋巴瘤)和CD3(用于识别T-细胞淋巴瘤)。

[0199] 上述方法可以用于分析来自受试者的细胞以确定例如所述细胞是正常还是异常或确定所述细胞对治疗是否作出反应。在一个实施方案中,所述方法可以用于确定癌细胞的发育异常程度。在这些实施方案中,所述细胞可以是来自多细胞器官的样品。生物样品可以从个体(例如从软组织)分离得到。在特定情况下,所述方法可以用于区分FFPE样品中不同类型的癌细胞。

[0200] 上述方法在使用多种抗体(各抗体识别不同标记物)检查平面样品中特别有用。下文显示癌症以及可以用于识别这些癌症的生物标记物的实例。在这些实施方案中,技术人员不需要检查下文所列的所有标记物来作出诊断。

[0201]

急性白血病 IHC 组	CD3、CD7、CD20、CD34、CD45、CD56、CD117、MPO、PAX-5 和 TdT。
腺癌与间皮瘤 IHC 组	Pan-CK、CEA、MOC-31、BerEP4、TTF1、钙网膜蛋白和 WT-1。
膀胱与前列腺癌 IHC 组	CK7、CK20、PSA、CK 903 和 p63。
乳腺 IHC 组	ER、PR、Ki-67 和 HER2。在 HER2 IHC 可用后对 HER2 FISH 有反射。
Burkitt 与 DLBC 淋巴瘤 IHC 组	BCL-2、c-MYC、Ki-67。
原发部位不明癌，女性(CUPS IHC 组-女性)	CK7、CK20、乳腺珠蛋白、ER、TTF1、CEA、CA19-9、S100、突触素和 WT-1。
原发部位不明癌，男性(CUPS IHC 组-男性)	CK7、CK20、TTF1、PSA、CEA、CA19-9、S100 和突触素。
GIST IHC 组	CD117、DOG-1、CD34 和肌间线蛋白。
肝癌/胆管与转移癌 IHC 组	HSA (HepPar 1)、CDX2、CK7、CK20、CAM

[0202]

	5.2、TTF-1 和 CEA (多克隆)。
霍奇金氏病与 NHL IHC 组	BOB-1、BCL-6、CD3、CD10、CD15、CD20、CD30、CD45 LCA、CD79a、MUM1、OCT-2、PAX-5 和 EBER ISH。
肺癌 IHC 组	嗜铬粒蛋白 A、突触素、CK7、p63 和 TTF-1。
肺与转移乳腺癌 IHC 组	TTF1、乳腺珠蛋白、GCDFP-15 (BRST-2) 和 ER。
淋巴瘤表型 IHC 组	BCL-2、BCL-6、CD3、CD4、CD5、CD7、CD8、CD10、CD15、CD20、CD30、CD79a、CD138、细胞周期蛋白 D1、Ki67、MUM1、PAX-5、TdT 和 EBER ISH。
淋巴瘤与癌 IHC 组	CD30、CD45、CD68、CD117、泛-角蛋白、MPO、S100 和突触素。
淋巴瘤与反应性增生 IHC 组	BCL-2、BCL-6、CD3、CD5、CD10、CD20、CD23、CD43、细胞周期蛋白 D1 和 Ki-67。
黑色素瘤与鳞状细胞癌 IHC 组	CD68、XIIIa 因子、CEA (多克隆)、S-100、黑色素瘤混合物(HMB-45、MART-1/黑色素-A、酪氨酸酶)和 Pan-CK。
错配修复蛋白 IHC 组(MMR/结肠癌)	MLH1、MSH2、MSH6 和 PMS2。
神经内分泌瘤 IHC 组	CD56、突触素、嗜铬粒蛋白 A、TTF-1、Pan-CK 和 CEA (多克隆)。
浆细胞瘤 IHC 组	CD19、CD20、CD38、CD43、CD56、CD79a、CD138、细胞周期蛋白 D1、EMA、κ、λ 和 MUM1。
前列腺与结肠癌 IHC 组	CDX2、CK 20、CEA (单克隆)、CA19-9、PLAP、CK 7 和 PSA。
软组织肿瘤 IHC 组	Pan-CK、SMA、肌间线蛋白、S100、CD34、波形蛋白和 CD68。
T 细胞淋巴瘤 IHC 组	ALK1、CD2、CD3、CD4、CD5、CD7、CD8、CD10、CD20、CD21、CD30、CD56

		、TdT 和 EBER ISH。
[0203]	T - LGL 白血病 IHC 组	CD3、CD8、颗粒酶 B 和 TIA-1。
	未分化肿瘤 IHC 组	Pan-CK、S100、CD45 和波形蛋白。

[0204] 在一些实施方案中,所述方法可以用于原位检测DNA分子和/或RNA分子的位置和(任选地)丰度。在一个示意性实施方案中,所述方法可以用于检测细胞内RNA。在这些实施方案中,所述捕获剂可以是核酸,并且可以原位检测RNA分子(例如mRNA或lncRNA)的细胞内位置和(任选地)丰度。此类杂交方法可以从已知RNA或DNA FISH方法(参见例如Mahadevaiah等人(Methods Mol Biol.2009 558:433-44)、Shaffer等人(PLoS One.2013 8:e75120)和Pollex等人(Methods Mol.Biol.2013 1042:13-31),这些文献在此通过引用并入)改造而来。

[0205] 在一些实施方案中,所述方法可以涉及获得上述图像(其电子形式可以已经发送自远程位置)并且可以由医生或其它医学专家分析以确定患者是否罹患异常细胞(例如,癌细胞)或存在哪种类型的异常细胞。所述图像可以用作诊断以确定受试者是否罹患疾病或病症例如癌症。在某些实施方案中,所述方法可以用于确定癌症阶段,例如以识别转移性细胞,或以监测患者对治疗的反应。

[0206] 本文所述的组合物和方法可以用于诊断罹患疾病的患者。在一些情况下,患者样品中生物标记物的存在与否可以指示所述患者罹患特定疾病(例如,癌症)。在一些情况下,患者可以通过比较来自所述患者的样品与来自健康对照的样品而被诊断患有疾病。在这个实施例中,相对于对照,可以测量生物标记物水平。患者样品中的生物标记物水平相对于对照的差异可以指示疾病。在一些情况下,分析一种或多种生物标记物以诊断罹患疾病的患者。本公开的组合物和方法特别适用于识别样品中多种生物标记物的存在与否,或测定其表现水平。

[0207] 在一些情况下,本文的组合物和方法可以用于确定针对患者的治疗计划。生物标记物的存在与否可以指示患者对特定疗法具有反应性或特定疗法难以治疗患者。例如,一种或多种生物标记物的存在与否可以指示特定疗法难以治疗疾病并且可以施用替代疗法。在一些情况下,患者目前正在接受治疗并且一种或多种生物标记物的存在与否可以指示所述疗法不再有效。

[0208] 在任何实施方案中,数据可以被发送到“远程位置”,其中“远程位置”意指除检查图像的位置以外的位置。例如,远程位置可以是同一城市的另一位置(例如,办公室、实验室等)、不同城市的另一位置、不同州的另一位置、不同国家的另一位置等。因此,当一个项目被指示为“远离”另一个项目,则意指两个项目可以位于相同房间但分开,或至少位于不同房间或不同建筑,并且可以为相距至少一英里,十英里或至少一百英里。“通信”信息指通过合适的通信通道(例如专用或公共网络)将表示所述信息的数据以电信号的形式传输。“发送”项目是指从一个位置到下一个位置获得所述项目的任何方式,而无论是通过物理方式传输所述项目还是以其它方式(在可能的情况下)并且包括(至少在数据的情况下)物理传输携带所述数据或通信所述数据的媒体。通信媒体的实例包括无线电或红外传输通道以及连接到另一计算机或联网设备的网络,以及因特网或包括电子邮件传输和记录在网站等上

的信息。在某些实施方案中,图像可以由MD或其它合格的医学专家进行分析,并且基于所述图像的分析结果的报告可以发送给被获得样品的患者。

[0209] 在一些情况下,所述方法可以用于各种诊断、药物发现和研究应用,包括但不限于诊断或监测疾病或病症(其中图像识别所述疾病或病症的标记物)、发现药物靶(其中图像中的标记物可以作为药物疗法的靶)、药物筛选(其中药物的效果是通过图像中所示的标记物来监测)、确定药物敏感性(其中药物敏感性与标记物相关)和基础研究(其中需要测量样品中细胞之间的差异)。

[0210] 在一些实施方案中,两种不同样品可以使用上述方法进行比较。不同样品可以由“实验”样品(即,感兴趣样品)和“对照”样品(实验样品可与之比较)组成。在许多实施方案中,不同样品是多对细胞类型或其部分,一种细胞类型是感兴趣细胞类型(例如异常细胞)而另一种是对照(例如正常细胞)。如果比较细胞的两个部分,那么这些部分通常是两种细胞中的每种的相同部分。然而,在一些实施方案中,可以比较相同细胞的两个部分。示意性细胞类型对包括例如从组织活检(例如罹患疾病例如结肠、乳腺、前列腺、肺、皮肤癌或感染病原体等的组织)分离得到的细胞和从相同组织(通常从相同患者)分离得到的正常细胞;永生的(例如,具有增殖突变或永生化转基因的细胞)、感染病原体的或经(例如环境或化学剂例如肽、激素、改变的温度、生长条件、物理应力、细胞转化等)处理的生长在组织培养基中的细胞和正常细胞(例如,其它方面与实验细胞一样,只是不为永生、未感染或未经处理等的细胞);从罹患癌症、疾病的哺乳动物、老年哺乳动物或显露病症的哺乳动物分离得到的细胞和从相同物种(优选从相同家族)的健康或年轻哺乳动物分离得到的细胞;以及从相同哺乳动物分离得到的分化细胞和未分化细胞(例如,在(例如)哺乳动物中,一种细胞为另一种细胞的祖先)。在一个实施方案中,可以使用不同类型的细胞(例如,神经元细胞和非神经元细胞)或不同状态的细胞(例如,刺激这些细胞之前和之后)。在本发明的另一个实施方案中,实验材料是易受病原体例如病毒(例如人类免疫缺陷病毒(HIV)等)感染的细胞,而对照材料是抗病原体感染的细胞。在另一个实施方案中,所述样品对由未分化细胞(例如干细胞)和分化细胞表示。

[0211] 由所述方法所产生的图像可以并排观察,或在一些实施方案中,所述图像可以叠加或组合。在一些情况下,所述图像可以是彩色的,其中图像中所用的彩色可以相当于所用的标记。

[0212] 例如来自(细菌、酵母、植物和动物例如鱼、鸟、爬行动物、两栖动物和哺乳动物的细胞任何有机体可以用于本方法中。在某些实施方案中,可以使用哺乳细胞(即,来自小鼠、兔子、灵长类或人类或其培养衍生物)。

[0213] 计算机系统

[0214] 本发明还提供一种经过配置以实施本发明方法的计算机系统。所述系统可以包括经过编程以实施本文所述方法的计算机服务器(“服务器”)。图21描绘系统1600,其经过调适以使用户实现检测、分析和处理样品图像。系统1600包括中央计算机服务器1601,其经过编程以实施本文所述的示意性方法。服务器1601包括中央处理单元(CPU,也称为“处理器”)1605,其可以为单核处理器、多核处理器或用于并行处理的多个处理器。服务器1601还包括存储器1610(例如,随机存取存储器、只读存储器、闪存存储器);电子存储单元1615(例如硬盘);用于与一个或多个其它系统通信的通信接口1620(例如,网络适配器);和外围设备

1625,其可以包括高速缓冲存储器、其它存储器、数据存储设备和/或电子显示适配器。存储器1610、存储单元1615、接口1620和外围设备1625是经由通信总线(实线)(例如主板)与处理器1605通信。存储单元1615可以是用于存储数据的数据存储单元。服务器1601是借助通信接口1620通过操作连接到计算机网络(“网络”)1630。网络1630可以是因特网、内联网和/或外联网、与因特网通信的内联网和/或外联网、电信或数据网络。网络1630在一些情况下借助服务器1601可以实施对等网络,其可以使连接到服务器1601的设备充当客户端或服务器。显微镜可以为外围设备1625或远程计算机系统1640。

[0215] 存储单元1615可以存储文件,例如个体图像、时延图像、关于个体细胞的数据、关于个体生物标记物的数据、显示捕获剂与样品结合的图案的图像、或与本发明有关的数据的任何方面。数据存储单元1615可以与细胞在虚拟网络中的位置有关的数据耦合。

[0216] 服务器可以经由网络1630与一个或多个远程计算机系统通信。所述一个或多个远程计算机系统可以是例如个人计算机、膝上型计算机、平板计算机、电话机、智能手机或个人数字辅助器。

[0217] 在一些情形下,系统1600包括单个服务器1601。在其它情形下,所述系统包括通过内联网、外联网和/或因特网与彼此通信的多个服务器。

[0218] 本文所述方法可以通过存储于服务器1601的电子存储位置(诸如例如存储于存储器1610或电子存储单元1615上)的机器(例如计算机处理器)计算机可读媒体(或软件)加以实施。在使用期间,代码可以通过处理器1605加以执行。在一些情况下,代码可以从存储单元1615检索并且存储在存储器1610上以供处理器1605即时访问。在一些情形下,可以省略电子存储单元1615,以及机器可执行指令存储于存储器1610上。或者,代码可以在第二计算机系统1640上执行。

[0219] 本文所提供的系统和方法的方面(例如服务器1601)可以呈编程方式加以实施。所述技术的各方面可以视为“产品”或“制品”,其通常呈携带于或实施于一种类型机器可读媒体(例如,计算机可读媒体)中的机器(或处理器)可执行代码和/或相关数据的形式。机器可执行代码可以存储在电子存储单元例如存储器(例如,只读存储器、随机存取存储器、闪存存储器)或硬盘上。“存储”类型媒体可以包括计算机、处理器等的任何或所有的有形存储器或其相关模组(例如各种半导体存储器、磁带驱动器、磁盘驱动器等),其可以在任何时候提供非临时性存储以供软件编程。软件的全部或部分可以有时经由因特网或各种其它电信网络通信。此类通信例如可以实现软件从一台计算机或处理器下载到另一台计算机或处理器中,例如从管理服务器或主计算机下载到应用服务器的计算机平台中。因此,另一种可以携带软件元件的媒体包括光波、电波和电磁波,例如经由有线和光陆线网络和各种空中链路在本地设备之间跨物理接口使用。携带此类波的物理元件(例如有线或无线连接、光链路等)也可视为携带软件的媒体。如本文所使用,除非限于非临时性有形“存储”媒体,否则术语诸如计算机或机器“可读媒体”是指参与提供指令给处理器以供执行的任何媒体。

[0220] 因此,机器可读媒体(例如计算机可读代码)可以采取许多形式,包括但不限于有形存储媒体、载波媒体或物理传输媒体。非易失性存储媒体可以包括例如光盘或磁盘(例如任何计算机等中的任何存储设备),此类可以用于实施所述系统。有形传输媒体可以包括:同轴电缆、铜线和光纤(包括包含计算机系统内的总线的线)。载波传输媒体可以采取电信号或电磁信号或声波或光波(例如在无线电频率(RF)数据通信和红外(IR)数据通信期间所

产生的那些)的形式。计算机可读媒体的普遍形式因此包括例如:软盘(floppy disk)、可折叠磁盘(flexible disk)、硬盘、磁带、任何其它磁性媒体、CD-ROM、DVD、DVD-ROM、任何其它光媒体、穿孔卡片、纸带(paper tape)、具有孔模式的任何其它物理存储媒体、RAM、ROM、PROM和EPROM、FLASH-EPROM、任何其它存储芯片或盒、载波传输数据或指令、传输此类载波的电缆或链路、或计算机可以读取编程代码和/或数据的任何其它媒体。计算机可读媒体的许多这种形式可以涉及将一个或多个指令的一个或多个序列携带给处理器以供执行。

[0221] 样品染色或标记的结果可以借助用户界面(例如图形用户界面)呈现给用户。

[0222] 试剂盒

[0223] 在一些方面中,本公开提供试剂盒。所述试剂盒可以包含任何数量的组合物以进行本公开的方法,各方法已描述于本文中。例如,试剂盒可以包含至少一种捕获剂。所述捕获剂可以是抗体、适体或寡核苷酸探针。所述捕获剂可以经过定制以与所需靶特异性结合。例如,用户可以定制一种或多种捕获剂以包括于所述试剂盒中。在一些情况下,所述捕获剂可以单独出售。所述捕获剂可以与感兴趣靶分子特异性结合。另外或者替代地,捕获剂可以组(即,预定选择的捕获剂)的形式定制。所述组可以特异于特定类型的疾病(例如疾病)或特定亚类型的疾病(例如,结肠癌)。本公开的试剂盒还可以包括一种或多种寡核苷酸。所述寡核苷酸可以包括第一链和双链,如文中所述。所述寡核苷酸可以呈单链寡核苷酸或双链寡核苷酸的形式提供。在后者情况下,所述试剂盒可以包括用于使寡核苷酸的第一链和第二链退火以产生双链寡核苷酸的试剂和/或说明书。单-或双链寡核苷酸可以与捕获剂缀合或可以呈非缀合形式提供。在后者中,所述试剂盒可以包括用于使双链寡核苷酸与捕获剂缀合的试剂(例如,用于进行点击化学的试剂)。在一些情况下,所述试剂盒可以提供多种寡核苷酸,其中各第一链是相同的而各第二链是不同的。所述试剂盒可以进一步包含文中公开的任何核苷酸混合物。核苷酸混合物可以包含荧光核苷酸、未标记核苷酸、可逆终止子核苷酸等的任何组合。一般来说,所述试剂盒中所提供的核苷酸混合物将与所提供的寡核苷酸相容。所述试剂盒可以进一步包含但不限于用于进行引物延伸的聚合酶、用于灭活信号的试剂(例如,TCEP)、阻断溶液(例如,碘乙酰胺溶液)和适合进行本文方法的任何缓冲液或溶液。所述试剂盒可以包含用于制备标记用样品的任何试剂例如固定剂(例如,甲醛)或用于包埋样品的试剂(即,石蜡)。所述试剂盒可以进一步包含用于与测试样品比较的对照样品。所述对照样品可以是健康样品或患病样品。所述对照样品可以匹配研究下的组织或细胞类型或研究的疾病。在一些情况下,所述对照样品可以是阳性对照或阴性对照。

[0224] 实施方案

[0225] 提供一种用于分析平面样品的方法。在某些实施方案中,所述方法包括:(a)用捕获剂培养平面样品,培养条件为使捕获剂与平面样品中的互补位点特异性结合,其中:(i)捕获剂与包含第一链和第二链的双链寡核苷酸连接;(ii)捕获剂是通过第一链的5'端与双链寡核苷酸连接;以及(iii)第一链的3'端是相对于第二链的5'端凹进,从而产生突出;(b)使捕获剂与平面样品交联;(c)使平面样品与聚合酶和核苷酸混合物接触,从而将一个或多个核苷酸添加到突出中;和/或使平面样品与短核苷酸混合物(其中的一些可以经过标记或没有经过标记)和DNA连接酶接触;以及(d)使用荧光显微法,读取通过将一个或多个核苷酸添加到突出中所产生的荧光信号,从而产生显示捕获剂与平面样品结合的图案的图像。在一些实施方案中,在已经读取样品之后,这种方法可以涉及移除荧光部分并且脱保护所添

加的荧光核苷酸,从而允许重复所述方法。

[0226] 在任何实施方案中,步骤(c)可以包括使平面样品与聚合酶和包含荧光核苷酸的核苷酸混合物接触,从而将荧光核苷酸添加到突出中,或使平面样品与一个或多个荧光标记寡核苷酸接触,从而将荧光标记核苷酸添加到突出中;以及步骤(d)包括读取通过将荧光核苷酸或寡核苷酸添加到突出中所产生的荧光信号。在这个实施方案中,所述荧光信号可以为:从所添加的核苷酸或寡核苷酸直接发射;由添加到突出中的两个核苷酸之间的能量转移所产生的FRET信号或由添加到突出中的第一荧光核苷酸与第二链中存在的第二荧光核苷酸之间的能量转移所产生的FRET信号。

[0227] 在一些实施方案中,第一链的延伸会从与第二链杂交的位于第一链下游的淬灭荧光标记寡核苷酸移除淬灭剂。

[0228] 在任何实施方案中,所述样品可以为福尔马林固定的石蜡包埋的(FFPE)切片。

[0229] 文中还提供了与双链寡核苷酸连接的捕获剂,其中:(i)双链寡核苷酸包含第一链和第二链;(ii)所述捕获剂与第一链的5'端连接;(iii)第一链的3'端是相对于第二链的5'端凹进,从而产生突出或(iiii)5'端是相对于第二链的3'端凹进,从而产生突出。

[0230] 文中还提供了一种捕获剂组合物,其包含多种识别不同互补位点的捕获剂,其中:每种捕获剂与包含第一链和第二链的双链寡核苷酸连接;捕获剂通过第一链的5'端与双链寡核苷酸连接;各双链寡核苷酸中的第一链的3'端是相对于第二链的5'端凹进,从而产生突出;并且突出对于每种捕获剂而言是不同的。或者,5'端是相对于第二链的3'端凹进,从而产生特异于每种捕获剂的突出。在这个实施方案中,第一链的序列对于每种捕获剂而言是相同的;而第二链的序列对于每种捕获剂而言可以是不同的。

[0231] 在这些实施方案中,所述突出可以具有式 $3' - N_{4n}N_1/N_2/N_3$,其中 N_1 、 N_2 、 N_3 和 N_4 是选自G、A、T和C的不同核苷酸并且 n 为1或以上,或式 $3' - YN_1/N_2 - 5'$,任选地在5'端后接具有随机核苷酸的短延伸物以增加DNA双链体上的总体聚合酶驻留,其中 Y 是由交替延伸的碱基 N_3 和 N_4 构成,并且其中 N_1 、 N_2 、 N_3 和 N_4 是选自G、A、T和C的不同核苷酸。

[0232] 还提供了一种分析组织样品的方法。在这些实施方案中,所述方法可以包括(a)用先前实施方案的捕获剂组合物培养平面样品,培养条件为使捕获剂与平面样品中的位点特异性结合;(b)使捕获剂与平面样品交联;(c)使平面样品与聚合酶和不完全核苷酸混合物或包含可逆终止子核苷酸的核苷酸混合物和/或连接酶和标记寡核苷酸接触;以及(d)使用荧光显微法,读取通过将核苷酸添加到一些但非全部的捕获剂中所产生的荧光信号。

[0233] 在这个实施方案中,所述方法可以包括:(c)使平面样品与聚合物和以下各项接触:(i)包含与 N_1 、 N_2 和 N_3 互补的荧光核苷酸和与 N_4 互补的可逆终止子核苷酸的核苷酸混合物或(ii)包含与 N_1 和 N_2 互补的荧光核苷酸、与 N_3 互补的未标记核苷酸而不含与 N_4 互补的核苷酸的核苷酸混合物,从而将荧光核苷酸添加到一些但非全部的捕获剂的双链核酸上。这个步骤还可以通过连接(即,通过使平面样品与标记寡核苷酸(或其混合物)接触)来完成,其中标记寡核苷酸的添加取决于突出的底部序列。这种方法还包括:(d)使用荧光显微法,读取通过添加将荧光核苷酸添加到一些但非全部的捕获剂中所产生的荧光信号。在这些实施方案中,所述突出可以具有式 $3' - N_{4n}N_1/N_2/N_3$,其中 N_1 、 N_2 、 N_3 和 N_4 是选自G、A、T和C的不同核苷酸并且 n 为1或以上;并且步骤(c)包括使平面样品与聚合酶和核苷酸混合物接触,所述核苷酸混合物包含与 N_1 、 N_2 和 N_3 互补的荧光核苷酸和与 N_4 互补的可逆终止子核苷酸。这个步骤

还可以通过使用连接酶添加标记寡核苷酸加以实施。在这些实施方案中,所述方法可以包括(e)灭活荧光信号,脱保护可逆终止子核苷酸以及阻断样品;以及(f)重复步骤(c)和(d)。在一些情况下,步骤(f)可以包括重复步骤(c)、(d)和(e)多次。或者,所述突出可以具有式 $3'-YN_1/N_2-5'$,任选地在5'端后接具有随机核苷酸的短延伸物以增加DNA双链体上的总体聚合酶驻留,其中Y是由交替延伸的碱基 N_3 和 N_4 构成,并且其中 N_1 、 N_2 、 N_3 和 N_4 是选自G、A、T和C的不同核苷酸。在这些实施方案中,所述方法可以进一步包括(e)灭活荧光信号以及使平面样品与聚合酶和与 N_4 互补的未标记核苷酸接触;以及(f)重复步骤(c)和(d)。在一些情况下,步骤(f)可以包括重复步骤(c)、(d)和(e)多次。

[0234] 在一些实施方案中,所述双链寡核苷酸各包含与第二链杂交的位于第一链下游的荧光标记寡核苷酸,其中所述荧光标记寡核苷酸包含淬灭剂并且第一链的延伸会从一些但非全部的淬灭荧光标记寡核苷酸移除淬灭剂,从而产生一些但非全部的捕获剂的荧光信号。

[0235] 实施例I

[0236] 材料和方法

[0237] 使固定于2%甲醛中、经过透化并且储存在-80甲醇中的脾脏细胞在旋转器上从甲醇离心,再悬浮并且用缓冲液4(10mM Tris&.5、10mM MgCl₂、150mM NaCl、0.1% Triton x100)冲洗5分钟。为阻断抗体-寡核苷酸复合物的非特异性结合,将细胞进一步离心,再悬浮于1ml PBS,0.5%BSA(SM)中并且补充了额外的0.5M NaCl(0.9ml SM+100ul 5M NaCl)。将20ul剪切的ssDNA(10mg/ml)、50ul小鼠IgG(10mg/ml)和20ul 0.5M EDTA进一步添加到1ml细胞中并且将混合物在旋转器上培养30分钟。为进行染色,将细胞重新分配到30个具有预先制备的抗体/寡核苷酸复合物(在每管中使0.2ug CD45-146复合物与1ul特异性寡核苷酸(147等)在40C下退火30分钟)的250ul管(就此而言,PCR条管是简易选择)中,并且旋转培养1小时。用(PBS、0.1%Triton、0.5M盐、5mM EDTA)冲洗细胞两次,放置在聚赖氨酸处理过的玻璃载玻片上,让其静置/附着10分钟并且用含5mM BS3(每4ml中7.4mg)的PBS(0.1% Triton、0.5M NaCl、5mM EDTA)进一步固定1小时。

[0238] 在循环中呈现染色。对于奇数循环(1、3、5、7、9、11、13、15),将盖玻片在dG/dU混合物(每ml 4号缓冲液(10mM Tris 7.5、0.5M NaCl、0.1%Triton x100、10mM MgCl₂)中有150nM dG,150nM dUssCy5,150nM dCcsCy3,25ul NEB exo-Klenow)中培养2分钟,用405(4号缓冲液,补充了0.65M NaCl)冲洗两次,并且通过共聚焦显微法成像。成像之后,通过在缓冲液405E(10mM Tris 7.5、0.5M NaCl、0.1%Triton x100、5mM EDTA)中在50mM TCEP中培养2分钟,从细胞裂解掉荧光团。裂解之后,用405E冲洗细胞并且用碘乙酰胺溶液(新鲜制备的含100mM碘乙酰胺的缓冲液405E)阻断1分钟。通过用4号缓冲液冲洗两次移除阻断溶液。在进行到下一循环之前,再次通过共聚焦显微法使细胞成像。偶数循环(2、4、6、8、10、12、14)与奇数循环一样地进行,只是在标记步骤中用dA取代dG并且裂解延伸在室温下持续4分钟。

[0239] 初步数据

[0240] 为探索通过引物延伸进行原位染色的可能性,使CD4的表现在悬浮的(图11)或固定在载玻片上(图12)的小鼠脾脏细胞中可视化。为可视化,用常规TcrB-Ax488抗体共染色T淋巴细胞脾脏细胞。两种样品均用如(图11A)中的与寡核苷酸双链体缀合的CD4抗体染色。

在对照样品中不添加Klenow聚合酶,从而导致TcrB阳性T-细胞不成分子组(图11B)。当提供Klenow聚合酶时,可以观察到CD4阳性T-细胞呈TcrB阳性T-细胞的Cy5阳性子组(图11C和图12)。通过载玻片上染色的细胞的共聚焦成像观察到清晰膜染色图案(图12A)。这些资料一起显示载玻片上引物延伸反应可以用于呈现捕获剂结合图案。

[0241] 图11.通过引物延伸染色的小鼠脾脏细胞的流式细胞术分析。固定小鼠脾脏细胞并且用甲醇透化,像进行细胞内蛋白质染色一样来操作。用常规TcrB-Ax488抗体和如(A)中的与寡核苷酸双链体缀合的CD4抗体共染色细胞。染色之后,将细胞培养在具有dUTP-Cy5的不具有(B)或具有(C)Klenow exo^{-} 聚合酶的延伸缓冲液中。注意(B)中的TcrB阳性T-细胞通过Ax-488染色指示。依赖于Klenow的添加,看到TcrB阳性CD4阳性T-细胞在(C)中呈TcrB阳性T-细胞的Cy5阳性子组。

[0242] 图12.通过引物延伸染色的小鼠脾脏细胞的载玻片上分析。固定小鼠脾脏细胞并且用甲醇透化,像进行细胞内蛋白质染色一样来操作。使细胞附着到涂覆有聚赖氨酸的载玻片上并且用常规TcrB-Ax488抗体和如图12A中的与寡核苷酸双链体缀合的CD4抗体共染色细胞。染色之后,将细胞培养在具有dUTP-Cy5 Klenow exo^{-} 聚合酶的延伸缓冲液中并且通过共聚焦显微法可视化。C中显示DIC图像、A中Cy5通道、B中Ax488通道和D中合并的Ax488和Cy5通道。注意只有(B)中的TcrB-Ax488阳性T细胞的子组通过引物延伸呈现Cy5阳性CD4阳性T细胞,如在(A)中所见一样。CD4的膜图案表明了通过引物延伸进行染色的特异性,因为其发生在特定的预期亚细胞定位处。

[0243] 为证明通过引物延伸多重检测若干抗原的可能性,通过方法1和(具体来说)基于“可逆终止子”的多重方法共分析固定在载玻片上的小鼠脾脏细胞中的CD4和CD8的表现。所述细胞通过与寡核苷酸双链体缀合的CD4和CD8抗体来同时染色,如(图14,A)中同时。进行两个呈现循环,使得CD8在第一个循环(图14,C)中可视化和使CD4在第二个循环(图14,D)中可视化。将细胞用TcrB-Ax488反染色以描绘脾脏细胞中的T淋巴细胞。如预期,CD4阳性细胞呈现为TcrB阳性T-细胞的子组,其与T-淋巴细胞的CD8阳性子组相互排斥(图14,A-D)。资料表明通过聚合物(DNA-双链体)延伸呈现抗体染色是一种实现灵敏抗原检测和多重的方法。

[0244] 图13.使用方法1和可逆终止子进行小鼠脾脏细胞中CD4和CD8染色的两个循环分析。固定小鼠脾脏细胞并且用甲醇透化,像进行细胞内蛋白质染色一样来操作。使细胞附着到涂覆有聚赖氨酸的载玻片上并且用与常规TcrB-Ax488抗体和如(A)中指示的与寡核苷酸缀合的CD4和CD8抗体的混合物共染色细胞。对于第一循环染色,将细胞培养在具有Illumina可逆终止子和Klenow exo^{-} 聚合酶的延伸缓冲液中并且通过共聚焦显微法(C)可视化。在第一循环后成像之后,通过含有TCEP的Illumina可裂解缓冲液使细胞脱色。在脱色终止子再激活之后,将细胞再培养在具有Illumina可逆终止子和Klenow exo^{-} 聚合酶的延伸缓冲液中并且通过共聚焦显微法(D)可视化。注意四个T-细胞通过高水平的TcrB识别并且在(B)上由四个白色箭头标记。在第一循环染色后变得明显的是,这些细胞中的两个细胞是CD8a阳性(在(C)上由紫色箭头标记)。第二循环染色揭示另外两个细胞是CD4阳性(在(D)上由绿色箭头标记)。CD4和CD8a的预期互斥性以及并入的标记核苷酸的膜图案进一步支持通过多个循环引物延伸进行的染色的特异性。

[0245] 在含有多种不同细胞子组的非均质组织的模型中测试“缺失碱基”多重方法(图14)。为此,将从均质小鼠脾脏获得的白细胞分成30个样品。CD45的30个不同版本是通过使

纯化的CD45与共同上链寡核苷酸缀合并且随后使30种不同下链寡核苷酸单独退火而制得的,这30种不同下链寡核苷酸是经过设计以产生可以在“缺失碱基方法”的多重版本中依序呈现(每个循环两种)的突出。将所述样品通过30种CD45抗体缀合物加以单独染色(条码化),冲洗掉未结合的CD45,混合条码化的样品并且附着到载玻片上。通过“缺失碱基”方法呈现假型细胞的这种混合物的染色。图15显示6个第一循环(12个群体,每个循环2个红色和绿色)以及通过在每个循环之间利用TCEP从修饰型碱基裂解掉荧光团来灭活荧光。如图可知,在各循环中以及循环之间没有相同的两种细胞被染色,这证明细胞上引物延伸可靠地呈现特异性抗体染色。

[0246] 为测试“缺失碱基”方法的表现和多重能力,采用以下模型方法,如图14和15中所示。使小鼠CD45抗体以化学方式与“上链”寡核苷酸(寡核苷酸id-146)缀合。将缀合抗体进一步划分并且单独退火(通过在40C下共培养30分钟)于30种不同“下链”寡核苷酸,因此有效产生30种不同种类的CD45抗体。30种“下链”寡核苷酸是根据“缺失碱基”策略并且另外以使得使用与不同荧光团(Cy5和Cy3)可逆(经由s-s接头)偶联的2种碱基(dUTP和dCTP)在每个循环呈现2种抗体的方式来设计。均质小鼠脾脏的30个样品已经过这些CD45-寡核苷酸双链体复合物以使得各样品中的大多数细胞变为经过特定CD45-上/下寡核苷酸组合标记的方式而“条码化”。染色和冲洗之后,组合样品以模拟具有30个不同细胞子组的组织。将混合物涂抹在载玻片上并且通过以“缺失碱基”方法进行循环染色使得每个染色循环中两个子组在不同成像通道上共同可视化来呈现。

[0247] 实施例2

[0248] 原位抗体信号扩增以及滚环扩增

[0249] 材料和方法

[0250] 如描述般制备大鼠抗小鼠B220抗体与146v2的缀合物。使所述缀合物与挂锁寡核苷酸(PatgctaccggttAATTACTGAAACATACACTAAAGATAACATTA ttctgcaag;SEQ ID NO:125)杂交,所述挂锁寡核苷酸是经过设计以在146v2上形成环形杂交体。将小鼠脾脏细胞用这些缀合物中的任一个进行染色,并且随后在37C下将那些经过挂锁构建体染色的细胞与T4 RNA连接酶(NEB)一起培养在制造商连接缓冲液中1小时并且随后与phi29聚合酶和dNTP混合物培养15分钟。细胞用PBS冲洗3次并且随后与10nM RCA产物检测寡核苷酸(TGA AACATACACTAAAGA;SEQ ID NO:126)一起培养10分钟。之后,用荧光dUTP-Cy5(Jena Biosciences)培养细胞,通过用在4号缓冲液中的200nM dUTP-Cy5和1ul exo-Klenow聚合酶(Thermo Scientific)培养并入所述细胞中。排出等分试样的细胞并且不进行滚环扩增(RCA)步骤并且随后用作参照以评估RCA对染色的效果。

[0251] 结果

[0252] 测试与抗体附接以增强抗体染色的多重DNA条码的滚环扩增的效率。组装含有退火于接头(146v2)寡核苷酸杂交体的环化‘挂锁’寡核苷酸的基于抗-B220抗体的特殊抗体-DNA缀合物并且用其将小鼠细胞染色。染色后,挂锁寡核苷酸用T4连接酶连接并且使用滚环方案以phi29聚合酶进行扩增,从而产生与各抗体附接的含有与检测引物互补的重复性序列的长重复性DNA延伸物。在使引物退火之后,可使多个dUTP-Cy5分子并入扩增的DNA分子中,因为其重复性质。图16图A-E示意性显示这种方法。图16图F-G显示以滚环扩增进行的细胞染色比没有滚环扩增时强得多。

[0253] 实施例3

[0254] 共检测分散的脾脏细胞上的22种抗原。

[0255] 材料和方法

[0256] 使用以下方案制备抗体缀合物。使抗体通过用含TCEP(最终浓度1mM)的PBS溶液pH 7.4在室温下培养30分钟而进行二硫键的部分还原。抗体是通过在饱和缀合缓冲液(PBS pH 7.0)的BioGel P-30旋转管柱上进行缓冲液交换而从TCEP纯化得到。携带受保护马来酰亚胺基团的寡核苷酸146v2(5' 马来酰亚胺-ATAGCAGTCCAGCCGAACGGTA GCATCTTGCAGAA;SEQ ID NO:127)是从Trilink股份有限公司订购。为按照制造商说明书准备与抗体共价交联,将存在于寡核苷酸上的马来酰亚胺基团通过Adler反应(90C下于甲苯中进行4h)加以脱保护/激活。通过在水乙醇中冲洗若干次从寡核苷酸移除甲苯。使激活的寡核苷酸溶解于缀合缓冲液中并且与还原的抗体以50:1的摩尔比混合。将氯化钠添加到缀合反应中,达成1M最终浓度。让缀合反应进行1小时。为移除未结合的寡核苷酸,将缀合抗体在分子量截留过滤器(Amicon 50KDa)上过滤4次。在具有0.5M氯化钠和0.1%Tween-20的磷酸缓冲液中进行最终冲洗和存储。

[0257] 为组装DNA双链体标签,将0.2ug缀合抗体与100pmol的底链寡核苷酸混合于具有0.6M氯化钠的磷酸缓冲液中并且在40°C下培养30分钟。

	v2_C_循环 1	SEQ ID NO:128:TTTTGTTCTGCAAGATGCTACCGTTCGGz
	v2_C_循环 2	SEQ ID NO:129:TTTTGtTTCTGCAAGATGCTACCGTTCGGz
	v2_C_循环 3	SEQ ID NO:130:TTTTGcTTCTGCAAGATGCTACCGTTCGGz
	v2_C_循环 4	SEQ ID NO:131:TTTTGTcTTCTGCAAGATGCTACCGTTCGGz
	v2_C_循环 5	SEQ ID NO:132:TTTTGCcTCtTTCTGCAAGATGCTACCGTTCGGz
	v2_C_循环 6	SEQ ID NO:133:TTTTGttcCcTCtTTCTGCAAGATGCTACCGTTCGGz
	v2_C_循环 7	SEQ ID NO:134:TTTTGcctttCcTCtTTCTGCAAGATGCTACCGTTCGGz
	v2_C_循环 8	TTTTGttcctttCcTCtTTCTGCAAGATGCTACCGTTCGGz (SEQ ID NO:135)
	v2_C_循环 9	TTTTGcttcctttCcTCtTTCTGCAAGATGCTACCGTTCGGz (SEQ ID NO:136)
	v2_C_循环 10	TTTTGtcttcctttCcTCtTTCTGCAAGATGCTACCGTTCGGz (SEQ ID NO:137)
[0258]	v2_C_循环 11	TTTTGecttcctttCcTCtTTCTGCAAGATGCTACCGTTCGGz (SEQ ID NO:138)
	v2_U_循环 1	SEQ ID NO:139:TTTTATTCTGCAAGATGCTACCGTTCGGz
	v2_U_循环 2	SEQ ID NO:140:TTTTAtTTCTGCAAGATGCTACCGTTCGGz
	v2_U_循环 3	SEQ ID NO:141:TTTTACtTTCTGCAAGATGCTACCGTTCGGz
	v2_U_循环 4	SEQ ID NO:142:TTTTATcTTCTGCAAGATGCTACCGTTCGGz
	v2_U_循环 5	SEQ ID NO:143:TTTTACcTCtTTCTGCAAGATGCTACCGTTCGGz
	v2_U_循环 6	SEQ ID NO:144:TTTTAttCcTCtTTCTGCAAGATGCTACCGTTCGGz
	v2_U_循环 7	SEQ ID NO:145:TTTTAcctttCcTCtTTCTGCAAGATGCTACCGTTCGGz
	v2_U_循环 8	TTTTAttcctttCcTCtTTCTGCAAGATGCTACCGTTCGGz (SEQ ID NO:146)
	v2_U_循环 9	TTTTActtcctttCcTCtTTCTGCAAGATGCTACCGTTCGGz (SEQ ID NO:147)
	v2_U_循环 10	TTTTAtcttcctttCcTCtTTCTGCAAGATGCTACCGTTCGGz (SEQ ID NO:148)
	v2_U_循环 11	TTTTAccttcctttCcTCtTTCTGCAAGATGCTACCGTTCGGz
[0259]		(SEQ ID NO:149)

[0260] 根据标准程序制备小鼠脾脏和骨髓细胞并且在室温下固定在2%甲醛中10分钟。固定后,离心细胞并且在-80下冷冻储存在含5%DMSO的PBS中或通过培养在冰冷甲醇中10分钟进行透化,并且进一步在-80℃下储存在甲醇中。

[0261] 在染色之前,储存的细胞用SM(0.5%BSA于PBS中,5mMEDTA)冲洗一次并且在室温下在染色缓冲液(含0.6M NaCl、0.5%BSA、50ug/ml大鼠IgG、200ug/ml ssDNA、5mMEDTA、3nmol/ml阻断寡核苷酸TTTTccctctcctcttcctttCcTCt-ddC的磷酸缓冲液pH 7.4)中阻断30分钟。假若使用冷冻切片,那么组织切片通过温暖盖玻片进行挑选并且立即放置于干冰中而不让切片变干。将具有切片的盖玻片在预先冷却到干冰温度的乙醇中浸渍30秒,并且转

移到含4%甲醛的SME中,持续20分钟。之后,固定的切片用SM冲洗两次并且进一步在染色缓冲液中阻断30分钟。在室温下将小鼠脾脏细胞在染色缓冲液中染色2-3小时,其中每100ul溶液含0.2ug各抗体的缀合抗体的混合物。在染色之后,细胞用SM05(补充了高达0.65M最终浓度NaCl的SM)冲洗两次,随后让细胞黏附到涂覆有聚-L-赖氨酸的盖玻片并且通过用含5mM BS3交联剂的PBS溶液进行20分钟培养进一步固定到盖玻片表面。在甲醇固定/透化之后,细胞用SM05冲洗一次,让细胞黏附到盖玻片表面并且通过用含5mM BS3交联剂的PBS溶液进行20分钟培养进一步固定到盖玻片表面。如果使用冷冻切片,那么在染色之后,用SM05冲洗切片两次并且通过用含5mM BS3交联剂的PBS溶液进行20分钟培养进一步固定。在染色程序和转化成平面形式(在悬浮细胞的情况下)之后,使所有类型的样品进行类似ABseq呈现方案。

[0262] 用缓冲液4(10mM Tris pH 6.5、10mM MgCl₂、150mM NaCl、0.1%Triton x100)冲洗具有细胞的盖玻片两次。

[0263] 通过利用聚合酶反应混合物进行的迭代培养呈现染色。在奇数循环(1、3、5...)中,将细胞在G-混合物(每ml含150nM dG、150nM dUssCy5、150nM dCssCy3、25ul NEB exo-Klenow的缓冲液4)中培养2分钟;用405(不含MgCl并且补充了高达最终0.65M NaCl的缓冲液4)冲洗3次;拍照;在含50mM TCEP的缓冲液405中培养2分钟;用405冲洗两次;拍照;在含新鲜配制100mM碘乙酰胺的缓冲液405中培养1分钟;用缓冲液4冲洗三次。在偶数循环(2、4、6...)中,将细胞在A-混合物(每ml含150nM dATP、150nM dUTPssCy5、150nM dCTPssCy3、25ul NEB exo-Klenow的缓冲液4)中培养2分钟;用405(不含MgCl并且补充了高达最终0.65M NaCl的缓冲液4)冲洗3次;拍照;在含50mM TCEP的缓冲液405中培养4分钟;用405冲洗两次;拍照;在含新鲜配制100mM碘乙酰胺的缓冲液405中培养1分钟;用4号缓冲液冲洗三次。可逆标记荧光核苷酸三磷酸由Jena Bioscience定制合成。

[0264] 结果

[0265] 使用22-抗体组,使用ABseq以探索小鼠脾脏和骨髓中的各种细胞子组。分离的脾脏和骨髓细胞通过利用NHS-PacBlu和NHS-Ax-488染料进行全细胞染色加以条码化,混合,用一组带有DNA双链体标签的22种抗体加以染色,附着到载玻片上并且在11次引物延伸和成像迭代中通过ABseq呈现(图17)。明显地,携带所有标记物表现数据的假色图像上的22色标记物表现数据证实不可能进行视觉解析,因为多色调色板中的颜色接近(图17,底部右图)。

[0266] 实施例4

[0267] 以间隔区进行的多组设计

[0268] 材料和方法

[0269] 抗体缀合、细胞染色和呈现是遵循章节4(共检测分散的脾脏细胞上的22种抗原)中的相同实验程序进行。将9个等分试样的脾脏细胞用不同CD45抗体-DNA缀合物单独染色。用以下方式形成各组的缀合物。

[0270] 组1:CD45与146v2(5'马来酰亚胺-ATAGCAGTCCAGCCGAACGGTAGCATCTTGCAGAA(SEQ ID NO:174)缀合并且与以下各项形成DNA双链体:

[0271] 1.TTTTATTCTGCAAGATGCTACCGTTCGG-二脱氧C(SEQ ID NO:150)

[0272] 2.TTTTAttTCTGCAAGATGCTACCGTTCGGz-二脱氧C(SEQ ID NO:151)

[0273] 3. TTTTACtTTCTGCAAGATGCTACCGTTCGGz-二脱氧C (SEQ ID NO:152)

[0274] Panel 2: CD45 与 146v2-ddC (5' 马来酰亚胺-ATAGCAGTC CAGCCGAACGGTAGCATCTTGCAGAA-二脱氧C) (SEQ ID NO:153) 缀合并且与以下各项形成DNA双链体:

[0275] 4. TTTTAGCGATTAAGCGTGAACCTTCTGCAAGATGCTACCGTTCGG-二脱氧C (SEQ ID NO:154)

[0276] 5. TTTTAtGCGATTAAGCGTGAACCTTCTGCAAGATGCTACCGTTCGGz-二脱氧C (SEQ ID NO:155)

[0277] 6. TTTTACtGCGATTAAGCGTGAACCTTCTGCAAGATGCTACCGTTCGGz-二脱氧C (SEQ ID NO:156)

[0278] Panel 3: CD45 与 146v2-ddC (5' 马来酰亚胺-ATAGCAGTCCAGCCGAACGGTAGCATCTTGCAGAA-二脱氧C) (SEQ ID NO:157) 缀合并且与以下各项形成DNA双链体:

[0279] 7. TTTTACGCTAATTCGCACTTGTCTGCAAGATGCTACCGTTCGG-二脱氧C (SEQ ID NO:158)

[0280] 8. TTTTAtCGCTAATTCGCACTTGTCTGCAAGATGCTACCGTTCGGz-二脱氧C (SEQ ID NO:159)

[0281] 9. TTTTACtCGCTAATTCGCACTTGTCTGCAAGATGCTACCGTTCGGz-二脱氧C (SEQ ID NO:160)

[0282] 在染色后,细胞用缓冲液4(10mM Tris pH 6.5、10mM MgCl₂、150mM NaCl、0.1% Triton x100) 冲洗两次以移除未结合的抗体-DNA缀合物并且随后将等分试样的细胞混合在一起并且附着在涂覆有赖氨酸的盖玻片上。抗原染色在以下顺序的培养中呈现:dGTP+dUTP-Cy5->dATP+dUTP-Cy5->dGTP+dUTP-Cy5->用含1uM间隔区1 (GTTTCACGCTTAATCGC; SEQ ID NO:161) 的4号缓冲液培养20分钟->dGTP+dUTP-Cy5->dATP+dUTP-Cy5->dGTP+dUTP-Cy5->用含1uM间隔区2 (CGCTAATTCGCACTTG; SEQ ID NO:162) 的4号缓冲液培养20分钟->dGTP+dUTP-Cy5->dATP+dUTP-Cy5->dGTP+dUTP-Cy5。成像、用50mM TCEP pH 7.0进行的荧光灭活以及用碘乙酰胺进行的背景阻断是在各呈现步骤之后进行。

[0283] 结果

[0284] 因为聚合酶错掺错误,所以预期通过Abseq进行的呈现的信号强度随循环数量不断增加而下降,如关于利用依序添加单个核苷酸开发深度测序方案的其它研究中所观察。为规避和避免使用与抗体连接的相当长DNA片段,测试所述设计的以下修正(图18,A图)。大抗体组可以分成子组,使得通过用ddC、丙基或任何其它3' 终止基团终止上链寡核苷酸来阻止这些子组上的延伸反应。在完成各子组的延伸后,通过短“激活”间隔区的原位杂交激活下一子组,短“激活”间隔区在其3' 端上不携带任何终止部分并且因此引发连续循环的引物延伸。这种设计通过对3个依序3-循环组(总共9个延伸循环)(图18,B图)以实验方式加以测试。图像定量显示观察到与组激活间隔区寡核苷酸的载玻片上杂交有关的ABseq呈现效率没有显著降低以及单个组之间没有信号延滞(图18,C图)。

[0285] 实施例5

[0286] 多重单分子RNA检测

[0287] 材料和方法

[0288] 使NALM和Jurkat细胞系生长到1百万个/ml的密度,用1.6%甲醛固定10分钟以及随后转移到冰冷甲醇中。等分试样的200K细胞用PBSTR (PBS、0.1% Tween-20和1:

1000Rnasin) 冲洗并且转移到杂交缓冲液 (1x SSC、10% 甲酰胺、10% 氧钒根-核糖核苷酸复合物、10% 聚乙烯磺酸) 中。将DNA探针混合物添加到100nM最终浓度并且在40C培养1小时。细胞用PBSTR在室温下冲洗2次,持续5分钟,以及在40度下用高盐缓冲液 (含4x SSC的PBSTR) 冲洗2次,持续20分钟,再用PBSTR冲洗一次并且转移到连接溶液 (0.1ul T4 DNA连接酶 (New England Biosciences)、5ul 10x T4连接酶缓冲液 (New England Biosciences)、45ul H₂O) 中。在37C下进行连接1小时。随后,将细胞转移到扩增溶液 (1ul phi29聚合酶 (Thermo Scientific)、5ul 10x聚合酶缓冲液 (Thermo Scientific)、1ul 10mM dNTP混合物、43ul H₂O) 并且在30C下培养1h。细胞用PBSTR冲洗并且在37C下用1mM“RCA检测”寡核苷酸培养10分钟并且转移到测序缓冲液 (10mM Tris pH 7.5、10mM MgCl₂、150mM NaCl、0.1% Triton x100、1:50Klenow聚合酶 (Thermo Scientific)、200mM dUTP-Cy5 (Jena Biosciences)) 中。细胞用高盐冲洗缓冲液 (10mM Tris pH 7.5、10mM MgCl₂、650mM NaCl、0.1% Triton x100) 冲洗两次并且使用荧光显微镜成像。

[0289]	HLA-DR 挂锁 1	PACATTAaaatcctagcacagggactcAATTATTACTGAAACATAC ACTAAAGATapa (SEQ ID NO:163)
	HLA-DR 夹板 引物 1	ctcatcagcacagctatgatgaTAATGTTATCTT (SEQ ID NO:164)
	HLA-DR 挂锁 2	PACATTAatagaactcggcctggatgatAATTATTACTGAAACATAC ACTAAAGATA (SEQ ID NO:165)
[0290]	HLA-DR 夹板 引物 2	ctgattggtcaggattcagaTAATGTTATCTT (SEQ ID NO:166)
	HLA-DR 挂锁 3	PACATTAatcaaagctggcaaatcgtccAATTATTACTGAAACATAC ACTAAAGATA (SEQ ID NO:167)
	HLA-DR 夹板 引物 2	tggccaatgcaccttgagccTAATGTTATCTT (SEQ ID NO:168)
	HLA-DR 挂锁 4	PACATTAatgattccaggttgcttgAATTATTACTGAAACATACA CTAAAGATA (SEQ ID NO:169)
	HLA-DR 夹板 引物 2	atagttggagcgtttgcaTAATGTTATCTT (SEQ ID NO:170)
	HLA-DR 挂锁 5	PACATTAatcgaagccacgtgacattAATTATTACTGAAACATACA CTAAAGATA (SEQ ID NO:171)
	HLA-DR 夹板 引物 2	ctgtggtgacaggtttccaTAATGTTATCTT (SEQ ID NO:172)
	RCA 检测	CATACACTAAAGATAACAT (SEQ ID NO:173)

[0291] 结果

[0292] 施用载玻片上引物延伸方案以检测NALM祖B细胞系中的人类HLADRA mRNA单分子。使用Jurkat T细胞淋巴系作为阴性对照以评估背景。为实现单分子mRNA检测,基于邻位连接和滚环扩增(RCA)设计信号扩增系统。用以下方式设计五对探针:使各对两个寡聚核苷酸与HLADRA mRNA的直接相邻的20-nt延伸物互补以及上游寡核苷酸的3'区域充当夹板以供下游挂锁寡核苷酸的环化(图19,A)以及充当引物以进行滚环扩增。在复合物组装之后,冲洗细胞并且用T4DNA连接酶处理以使挂锁寡核苷酸环化并且用phi29聚合酶和dNTP混合物培养以进行滚环扩增(图19,B)。用“RCA检测”寡核苷酸培养扩增产物(图19,C)以及随后通

过单碱基延伸以Klenow聚合酶并入荧光dUTP-Cy5(图19,D)。冲洗细胞并且用荧光显微镜成像。表现HLADR的NALM细胞的图像显示细胞质中对应于RCA产物的丰富点状染色(图19,E)以及HLADR阴性的Jurkat细胞显示极少斑点(图19,F),这证实HLADR mRNA的基于邻位连接的检测的高特异性。

[0293] 本发明涉及以下实施方式:

[0294] 1.一种用于分析平面样品的方法,所述方法包括:

[0295] (a)用捕获剂标记所述平面样品以产生标记样品,其中:

[0296] (i)所述捕获剂与包含第一链和第二链的双链核酸连接;并且

[0297] (ii)所述第一链或所述第二链的3'端或5'端可以使用另一链作为模板来延伸;

[0298] (b)使所述标记样品与i.聚合酶和多个核苷酸和/或ii.标记寡核苷酸和连接酶接触,从而将所述多个核苷酸中的一个或多个核苷酸和/或标记寡核苷酸添加到所述双链核酸的一条链的末端上;以及

[0299] (c)读取通过将所述一个或多个核苷酸和/或标记寡核苷酸添加到所述双链核酸的所述第一链或所述第二链中的一个上所产生的信号。

[0300] 2.根据实施方式1所述的方法,其中所述信号是荧光信号。

[0301] 3.根据实施方式2所述的方法,其中读取包括荧光显微法。

[0302] 4.根据任一前述实施方式所述的方法,其进一步包括产生显示所述捕获剂与所述平面样品结合的图案的图像。

[0303] 5.根据任一前述实施方式所述的方法,其中:

[0304] 步骤(b)包括使所述标记样品与聚合酶和包含荧光核苷酸的多个核苷酸接触,从而将所述荧光核苷酸添加到所述双链核酸的所述第一链或所述第二链中的一个上;以及

[0305] 步骤(c)包括读取通过将所述荧光核苷酸添加到所述双链核酸的所述第一链或所述第二链中的一个上所产生的荧光信号。

[0306] 6.根据实施方式5所述的方法,其中所述荧光信号是:i.从所添加的核苷酸直接发射;ii.由添加到所述双链核酸的第一链或第二链中的一个上的多个荧光核苷酸中的两个荧光核苷酸之间的能量转移所产生的FRET信号;或iii.由所添加的荧光核苷酸与已存在于第一链或第二链双链核酸中的一个中的第二荧光核苷酸之间的能量转移所产生的FRET信号。

[0307] 7.根据实施方式1到4中任一项所述的方法,其中:

[0308] 步骤(b)包括使所述标记样品与连接酶和标记寡核苷酸接触,从而将所述标记寡核苷酸添加到所述双链核酸的第一链或第二链中的一个上;以及

[0309] 步骤(c)包括读取通过将所述标记寡核苷酸添加到所述双链核酸的第一链或第二链中的一个上所产生的荧光信号。

[0310] 8.根据实施方式7所述的方法,其中所述荧光信号是:i.从所添加的标记核苷酸直接发射;ii.由添加到所述双链核酸的第一链或第二链中的一个上的两个标记核苷酸之间的能量转移所产生的FRET信号;或iii.由添加到所述双链核酸的第一链或第二链中的一个上的标记核苷酸与已存在于另一链中的第二荧光核苷酸之间的能量转移所产生的FRET信号。

[0311] 9.根据实施方式8所述的方法,其中所述标记核苷酸包含荧光核苷酸。

[0312] 10. 根据实施方式1所述的方法,其中所述双链核酸的第一链或第二链中的一个的延伸从与另一链杂交并且位于第一链的下游的淬灭荧光标记寡核苷酸移除淬灭剂。

[0313] 11. 根据实施方式1到10中任一项所述的方法,其中所述双链核酸的第一链为滚环扩增(RCA)产物,以及所述双链核酸的第二链包含与所述RCA产物中多个位点杂交的寡核苷酸。

[0314] 12. 根据实施方式1到10中任一项所述的方法,其中所述双链核酸的第一链为第一寡核苷酸,以及所述双链核酸的第二链为与所述第一寡核苷酸杂交的第二寡核苷酸。

[0315] 13. 根据实施方式1到12中任一项所述的方法,其中所述平面样品为福尔马林固定的石蜡包埋的(FFPE)切片。

[0316] 14. 根据实施方式1所述的方法,其中所述捕获剂为抗体、适体或寡核苷酸探针。

[0317] 15. 一种捕获剂,其与双链核酸连接,其中:

[0318] (i) 所述双链核酸包含第一链和第二链;

[0319] (ii) 所述捕获剂与所述第一链连接;以及

[0320] (iii) 所述第一链或所述第二链的5'端或3'端可以使用另一链作为模板来延伸。

[0321] 16. 一种捕获剂组合物,其包含多种各识别不同互补位点的捕获剂,其中:

[0322] 所述多种捕获剂中的每种与包含第一链和第二链的双链核酸连接;

[0323] 所述第一链或第二链的5'端或3'端可以使用另一链作为模板来延伸;并且

[0324] 紧接所述可延伸末端下游的模板对于所述多种捕获剂中的每种而言是不同的。

[0325] 17. 根据实施方式16所述的捕获剂组合物,其中:

[0326] 所述第一链的序列对于所述多种捕获剂中的每种而言是相同的;而

[0327] 所述第二链的序列对于所述多种捕获剂中的每种而言是不同的。

[0328] 18. 根据实施方式16所述的组合物,其中与所述可延伸3'端紧邻的模板具有式3'- $N_{4n}N_1/N_2/N_3$,其中 N_1 、 N_2 、 N_3 和 N_4 是选自G、A、T和C的不同核苷酸并且n为1或以上。

[0329] 19. 根据实施方式16所述的组合物,其中与所述可延伸3'端紧邻的模板具有式3'- YN_1/N_2-5' ,任选地在5'端后接具有随机核苷酸的短延伸物以增加DNA双链体上的总体聚合酶驻留,其中Y是由交替延伸的 N_3 和 N_4 构成,且其中 N_1 、 N_2 、 N_3 和 N_4 是选自G、A、T和C的不同核苷酸。

[0330] 20. 一种用于分析平面样品的方法,其包括:

[0331] (a) 用实施方式16到19中任一项所述的捕获剂组合物标记所述平面样品;

[0332] (b) 使所述标记样品与i. 聚合酶和不完全核苷酸混合物或包含可逆终止子核苷酸的核苷酸混合物接触,从而将核苷酸添加到所述多种捕获剂中;和/或与ii. 标记寡核苷酸和连接酶接触,从而将标记寡核苷酸添加到所述多种捕获剂中;以及

[0333] (c) 读取通过将所述核苷酸或所述标记寡核苷酸添加到一些但非全部的所述多种捕获剂中所产生的信号。

[0334] 21. 根据实施方式20所述的方法,其中所述信号包含荧光信号。

[0335] 22. 根据实施方式21所述的方法,其中所述读取包括荧光显微法。

[0336] 23. 根据实施方式20所述的方法,其包括:

[0337] (b) 使所述平面样品与聚合酶和以下各项接触:(i) 包含多个与 N_1 、 N_2 和 N_3 互补的荧光核苷酸和与 N_4 互补的可逆终止子核苷酸的核苷酸混合物;或(ii) 包含多个与 N_1 和 N_2 互补

的荧光核苷酸、与 N_3 互补的未标记核苷酸而不含与 N_4 互补的核苷酸的核苷酸混合物,从而将荧光核苷酸添加到一些但非全部的所述捕获剂的所述双链核酸上;以及

[0338] (c) 使用荧光显微法,读取通过将所述荧光核苷酸添加到一些但非全部的所述捕获剂的所述双链核酸中所产生的荧光信号。

[0339] 24. 根据实施方式23所述的方法,其中与所述可延伸3'端紧邻的模板具有式 $3' - N_{4n}N_1/N_2/N_3$,其中 N_1 、 N_2 、 N_3 和 N_4 是选自G、A、T和C的不同核苷酸并且n为1或以上;以及步骤(b)包括使所述平面样品与聚合酶和核苷酸混合物接触,所述核苷酸混合物包含多个与 N_1 、 N_2 和 N_3 互补的荧光核苷酸以及与 N_4 互补的可逆终止子核苷酸。

[0340] 25. 根据实施方式23所述的方法,其进一步包括:

[0341] (d) 灭活所述荧光信号,

[0342] (e) 任选地,脱保护所述可逆终止子核苷酸;

[0343] (f) 阻断所述样品;以及

[0344] (g) 重复步骤(b)和(c)。

[0345] 26. 根据实施方式25所述的方法,其中步骤(g)包括重复步骤(b)-(f)多次。

[0346] 27. 根据实施方式23所述的方法,其中与所述可延伸3'端紧邻的模板具有式 $3' - YN_1/N_2 - 5'$,任选地在5'端后接具有随机核苷酸的短延伸物以增加DNA双链体上的总体聚合酶驻留,其中Y是由交替延伸的 N_3 和 N_4 构成且其中 N_1 、 N_2 、 N_3 和 N_4 是选自G、A、T和C的不同核苷酸。

[0347] 28. 根据实施方式27所述的方法,其进一步包括:

[0348] (d) 灭活所述荧光信号;

[0349] (e) 使所述平面样品与聚合酶和与 N_4 互补的未标记核苷酸接触;以及

[0350] (f) 重复步骤(b)和(c)。

[0351] 29. 根据实施方式28所述的方法,其中步骤(f)包括重复步骤(b)-(e)多次。

[0352] 30. 根据实施方式20所述的方法,其中所述双链核苷酸各包含与所述第二链杂交的位于所述第一链下游的荧光标记寡核苷酸,其中所述荧光标记寡核苷酸包含淬灭剂,并且所述第一链的延伸从一些但非全部的所述淬灭荧光标记寡核苷酸移除所述淬灭剂,从而产生一些但非全部的所述多种捕获剂的荧光信号。

[0353] 31. 根据实施方式20所述的方法,其中所述双链核酸的延伸包括使所述平面样品与标记寡核苷酸和未标记寡核苷酸的混合物以及连接酶接触。

[0354] 32. 根据实施方式20所述的方法,其中所述多种捕获剂是选自由以下组成的组:抗体、适体和寡核苷酸探针。

[0355] 33. 一种试剂盒,其包含:

[0356] (a) 一种或多种捕获剂,其中所述一种或多种捕获剂可以与平面样品中的互补位点特异性结合。

[0357] (b) 一种或多种包含第一链第二链的双链核酸,

[0358] 其中所述一种或多种捕获剂中的每种与所述双链核酸连接,并且其中所述第一链或所述第二链的5'端或3'端可以使用另一链作为模板来延伸。

[0359] 34. 根据实施方式33所述的试剂盒,其进一步包含聚合酶。

[0360] 35. 根据实施方式34所述的试剂盒,其进一步包含核苷酸混合物,其包含荧光核苷

酸、未标记核苷酸和可逆终止子核苷酸中的至少一种。

[0361] 36. 根据实施方式33所述的试剂盒,其中所述一种或多种捕获剂是选自由以下组成的组:抗体、适体和寡核苷酸探针。

序列表

<110> The Board of Trustees of the Leland Stanford Junior

Samusik, Nikolay

Nolan, Garry P

Goltsev, Yury

<120> 通过引物延伸进行载玻片上染色

<130> STAN-1122W0

<150> US 62/015,799

<151> 2014-06-23

<150> US 14/560,921

<151> 2014-12-04

<160> 174

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> 13

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (1) .. (1)

<223> n是尿苷

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (5) .. (5)

<223> n是尿苷

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (9) .. (9)

<223> n是尿苷

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (13) .. (13)

<223> n是尿苷

<400> 1

naaanaaana aan

<210> 2

<211> 13	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 2	
atattattat tta	13
<210> 3	
<211> 11	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<220>	
<221> 尚未归类的特征	
<222> (1) .. (1)	
<223> n是尿苷	
<220>	
<221> 尚未归类的特征	
<222> (5) .. (5)	
<223> n是尿苷	
<220>	
<221> 尚未归类的特征	
<222> (11) .. (11)	
<223> n是尿苷	
<400> 3	
naacnaacaa n	11
<210> 4	
<211> 13	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 4	
attgttattg tta	13
<210> 5	
<211> 42	
<212> DNA	
<213> 人工序列	

<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<220>		
<221>	尚未归类的特征	
<222>	(42) .. (42)	
<223>	c是双脱氧胞苷	
<400>	5	
	ttctaggggg ggggggggtc gtcaagatgc tacggttcag gc	42
<210>	6	
<211>	34	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<220>		
<221>	尚未归类的特征	
<222>	(1) .. (1)	
<223>	5'端与抗体连接	
<400>	6	
	atagcgctac cctgaacggt agcatcttga cgac	34
<210>	7	
<211>	42	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<220>		
<221>	尚未归类的特征	
<222>	(42) .. (42)	
<223>	c是双脱氧胞苷	
<400>	7	
	ttctaacgat ctagtccggc gtcaagatgc tacggttcag gc	42
<210>	8	
<211>	35	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<220>		

<221> 尚未归类的特征	
<222> (1) .. (1)	
<223> 5'端与抗体连接	
<400> 8	
atagcgctac gcctgaacgg tagcatcttg acgac	35
<210> 9	
<211> 41	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 9	
tttactctc tctctctgtc gtcaagatgc taccgttcag g	41
<210> 10	
<211> 35	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<220>	
<221> 尚未归类的特征	
<222> (1) .. (1)	
<223> 5'端与抗体连接	
<400> 10	
atagcgctac gcctgaacgg tagcatcttg acgac	35
<210> 11	
<211> 41	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 11	
tttactcct ttctctgtc gtcaagatgc taccgttcag g	41
<210> 12	
<211> 35	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	

<220>		
<221>	尚未归类的特征	
<222>	(1) .. (1)	
<223>	5'端与抗体连接	
<400>	12	
	atagcgctac gcctgaacgg tagcatcttg acgac	35
<210>	13	
<211>	35	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<220>		
<221>	尚未归类的特征	
<222>	(1) .. (1)	
<223>	5'端与抗体连接	
<220>		
<221>	尚未归类的特征	
<222>	(35) .. (5)	
<223>	c是双脱氧胞苷	
<400>	13	
	atagcgctac gcctgaacgg tagcatcttg acgac	35
<210>	14	
<211>	52	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<220>		
<221>	尚未归类的特征	
<222>	(7) .. (27)	
<223>	n是a、c、g或t	
<220>		
<221>	尚未归类的特征	
<222>	(52) .. (52)	
<223>	c是双脱氧胞苷	
<400>	14	
	tttttannnn nnnnnnnnnn nnnnnnngtc gtcaagatgc taccgttcag gc	52
<210>	15	

- <211> 35
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成寡核苷酸
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (1) .. (1)
 <223> 5'端与抗体连接
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (35) .. (35)
 <223> c是双脱氧胞苷
 <400> 15
 atagcgctac gcctgaacgg tagcatcttg acgac 35
 <210> 16
 <211> 53
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成寡核苷酸
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (8) .. (28)
 <223> n是a、c、g或t
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (53) .. (53)
 <223> c是双脱氧胞苷
 <400> 16
 tttttacnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnngt cgtaagatg ctaccgttca ggc 53
 <210> 17
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成寡核苷酸
 <220>
 <221> 尚未归类的特征

- <222> (1) .. (1)
 <223> 5'端与抗体连接
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (35) .. (35)
 <223> c是双脱氧胞苷
 <400> 17
 atagcgctac gcctgaacgg tagcatcttg acgac 35
 <210> 18
 <211> 54
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成寡核苷酸
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (9) .. (29)
 <223> n是a、c、g或t
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (54) .. (54)
 <223> c是双脱氧胞苷
 <400> 18
 tttttactnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnng tcgtcaagat gctaccgttc aggc 54
 <210> 19
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成寡核苷酸
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (1) .. (1)
 <223> 5'端与抗体连接
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (35) .. (5)
 <223> c是双脱氧胞苷
 <400> 19

atagcgctac gcctgaacgg tagcatcttg acgac	35
<210> 20	
<211> 52	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<220>	
<221> 尚未归类的特征	
<222> (7) .. (27)	
<223> n是a、c、g或t	
<220>	
<221> 尚未归类的特征	
<222> (52) .. (52)	
<223> c是双脱氧胞苷	
<400> 20	
tttttannnn nnnnnnnnnn nnnnnnngtc gtcaagatgc taccgttcag gc	52
<210> 21	
<211> 35	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<220>	
<221> 尚未归类的特征	
<222> (1) .. (1)	
<223> 5'端与抗体连接	
<220>	
<221> 尚未归类的特征	
<222> (35) .. (35)	
<223> c是双脱氧胞苷	
<400> 21	
atagcgctac gcctgaacgg tagcatcttg acgac	35
<210> 22	
<211> 53	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	

- <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (8) .. (28)
 <223> n是a、c、g或t
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (53) .. (53)
 <223> c是双脱氧胞苷
 <400> 22
 tttttacnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnngt cgtaagatg ctaccgttca ggc 53
 <210> 23
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成寡核苷酸
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (1) .. (1)
 <223> 5'端与抗体连接
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (35) .. (35)
 <223> c是双脱氧胞苷
 <400> 23
 atagcgctac gcctgaacgg tagcatcttg acgac 35
 <210> 24
 <211> 54
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成寡核苷酸
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (9) .. (29)
 <223> n是a、c、g或t
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (54) .. (54)

<223> c是双脱氧胞苷	
<400> 24	
tttttactnn nnnnnnnnnn nnnnnnnng tcgtcaagat gctaccgttc aggc	54
<210> 25	
<211> 35	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<220>	
<221> 尚未归类的特征	
<222> (1) .. (1)	
<223> 5'端与抗体连接	
<220>	
<221> 尚未归类的特征	
<222> (35) .. (35)	
<223> c是双脱氧胞苷	
<400> 25	
atagcgctac gcctgaacgg tagcatcttg acgac	35
<210> 26	
<211> 52	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<220>	
<221> 尚未归类的特征	
<222> (7) .. (27)	
<223> n是a、c、g或t	
<220>	
<221> 尚未归类的特征	
<222> (52) .. (52)	
<223> c是双脱氧胞苷	
<400> 26	
tttttanannn nnnnnnnnnn nnnnnnngtc gtcaagatgc taccgttcag gc	52
<210> 27	
<211> 35	
<212> DNA	
<213> 人工序列	

<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<220>		
<221>	尚未归类的特征	
<222>	(1) .. (1)	
<223>	5'端与抗体连接	
<220>		
<221>	尚未归类的特征	
<222>	(35) .. (35)	
<223>	c是双脱氧胞苷	
<400>	27	
	atagcgctac gcctgaacgg tagcatcttg acgac	35
<210>	28	
<211>	53	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<220>		
<221>	尚未归类的特征	
<222>	(8) .. (28)	
<223>	n是a、c、g或t	
<220>		
<221>	尚未归类的特征	
<222>	(53) .. (53)	
<223>	c是双脱氧胞苷	
<400>	28	
	tttttacnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnngt cgtaagatg ctaccgttca ggc	53
<210>	29	
<211>	35	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<220>		
<221>	尚未归类的特征	
<222>	(1) .. (1)	
<223>	5'端与抗体连接	
<220>		

- <221> 尚未归类的特征
 <222> (35) .. (35)
 <223> c是双脱氧胞苷
 <400> 29
 atagcgctac gcctgaacgg tagcatcttg acgac 35
 <210> 30
 <211> 54
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成寡核苷酸
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (9) .. (29)
 <223> n是a、c、g或t
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (54) .. (54)
 <223> c是双脱氧胞苷
 <400> 30
 tttttactnn nnnnnnnnnn nnnnnnnng tcgtcaagat gctaccgttc aggc 54
 <210> 31
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成寡核苷酸
 <400> 31
 cctgaacggt agcatcttga cgac 24
 <210> 32
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成寡核苷酸
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (1) .. (1)
 <223> 5'端与淬灭剂连接

<220>		
<221>	尚未归类的特征	
<222>	(19) .. (19)	
<223>	3'端与荧光团连接	
<400>	32	
	aaaaaaaaaac gcggcccg	19
<210>	33	
<211>	44	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<400>	33	
	ccgggccg tttttttta gtcgtcaaga tgctaccgtt cagg	44
<210>	34	
<211>	44	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<220>		
<221>	尚未归类的特征	
<222>	(44) .. (44)	
<223>	3'端与荧光团连接	
<400>	34	
	cctgaacggt agcatcttga cgactaaaaa aaaacgcggc ccg	44
<210>	35	
<211>	44	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<400>	35	
	ccgggccg tttttttta gtcgtcaaga tgctaccgtt cagg	44
<210>	36	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		

<223> 合成寡核苷酸	
<400> 36	
cctgaacggg agcatcctga cgac	24
<210> 37	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<220>	
<221> 尚未归类的特征	
<222> (1) .. (1)	
<223> 5'端与淬灭剂连接	
<220>	
<221> 尚未归类的特征	
<222> (19) .. (19)	
<223> 3'端与荧光团连接	
<400> 37	
aaaaaaaaaac gcggcccg	19
<210> 38	
<211> 44	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 38	
ccgggccg tttttttta gtcgtcaaga tgctaccgtt cagg	44
<210> 39	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 39	
cctgaacggg agcatcctga cgac	24
<210> 40	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	

<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<220>		
<221>	尚未归类的特征	
<222>	(1) .. (1)	
<223>	5'端与淬灭剂连接	
<220>		
<221>	尚未归类的特征	
<222>	(19) .. (19)	
<223>	3'端与荧光团连接	
<400>	40	
	aaaaaaaaaac gcggcccg	19
<210>	41	
<211>	45	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<400>	41	
	ccgggccg tttttttta cgtcgtcaag atgctaccgt tcagg	45
<210>	42	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<400>	42	
	cctgaacggt agcatcttga cgac	24
<210>	43	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<220>		
<221>	尚未归类的特征	
<222>	(1) .. (1)	
<223>	5'端与淬灭剂连接	
<220>		

<221> 尚未归类的特征	
<222> (19) .. (19)	
<223> 3'端与荧光团连接	
<400> 43	
aaaaaaaaaac gcggcccgg	19
<210> 44	
<211> 46	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 44	
ccgggccgcg tttttttttc aggtcgtcaa gatgctaccg ttcagg	46
<210> 45	
<211> 44	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<220>	
<221> 尚未归类的特征	
<222> (44) .. (44)	
<223> 3'端与荧光团连接	
<400> 45	
cctgaacggt agcatcttga cgactaaaaa aaaacgcggc ccgg	44
<210> 46	
<211> 44	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 46	
ccgggccgcg ttttttttta gtcgtcaaga tgctaccggt cagg	44
<210> 47	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	

<400> 47	
cctgaacggt agcatcttga cgac	24
<210> 48	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<220>	
<221> 尚未归类的特征	
<222> (1) .. (1)	
<223> 5'端与淬灭剂连接	
<220>	
<221> 尚未归类的特征	
<222> (19) .. (19)	
<223> 3'端与荧光团连接	
<400> 48	
aaaaaaaaac gcggcccg	19
<210> 49	
<211> 45	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 49	
ccgggccgcg ttttttttta cgtcgtcaag atgctaccgt tcagg	45
<210> 50	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 50	
cctgaacggt agcatcttga cgac	24
<210> 51	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	

<223> 合成寡核苷酸	
<220>	
<221> 尚未归类的特征	
<222> (1) .. (1)	
<223> 5'端与淬灭剂连接	
<220>	
<221> 尚未归类的特征	
<222> (19) .. (19)	
<223> 3'端与荧光团连接	
<400> 51	
aaaaaaaaaac gcggccccg	19
<210> 52	
<211> 46	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 52	
ccgggccgcg ttttttttc aggtcgtcaa gatgctaccg ttcagg	46
<210> 53	
<211> 44	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 53	
cctgaacggt agcatcttga cgactaaaaa aaaacgcggc ccgg	44
<210> 54	
<211> 44	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 54	
ccgggccgcg ttttttttta gtcgtcaaga tgctaccgtt cagg	44
<210> 55	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	

<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<400>	55	
	cctgaacggt agcatccttga cgacg	25
<210>	56	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<220>		
<221>	尚未归类的特征	
<222>	(19) .. (19)	
<223>	3'端与荧光团连接	
<400>	56	
	aaaaaaaaaac gcggcccgg	19
<210>	57	
<211>	45	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<400>	57	
	ccgggccgcg ttttttttta cgtcgtcaag atgctaccgt tcagg	45
<210>	58	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<400>	58	
	cctgaacggt agcatccttga cgacc	25
<210>	59	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<220>		

<221> 尚未归类的特征	
<222> (1) .. (1)	
<223> 5'端与淬灭剂连接	
<220>	
<221> 尚未归类的特征	
<222> (19) .. (19)	
<223> 3'端与荧光团连接	
<400> 59	
aaaaaaaaaac gcggcccgg	19
<210> 60	
<211> 46	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 60	
ccgggccgcg ttttttttc aggtcgtcaa gatgctaccg ttcagg	46
<210> 61	
<211> 44	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 61	
cctgaacggg agcatcttga cgactaaaa aaaacgcggc ccgg	44
<210> 62	
<211> 44	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 62	
ccgggccgcg ttttttttta gtcgtcaaga tgctaccggt cagg	44
<210> 63	
<211> 45	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	

<220>		
<221>	尚未归类的特征	
<222>	(63) .. (63)	
<223>	3'端与荧光团连接	
<400>	63	
	cctgaacggt agcatcttga cgacgtaaaa aaaaacgcgg cccgg	45
<210>	64	
<211>	45	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<400>	64	
	ccgggccgcg ttttttttta cgtcgtcaag atgctaccgt tcagg	45
<210>	65	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<400>	65	
	cctgaacggt agcatcttga cgacct	26
<210>	66	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<220>		
<221>	尚未归类的特征	
<222>	(1) .. (1)	
<223>	5'端与淬灭剂连接	
<220>		
<221>	尚未归类的特征	
<222>	(19) .. (19)	
<223>	3'端与荧光团连接	
<400>	66	
	aaaaaaaaac gcggcccgg	19
<210>	67	

<211>	46	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<400>	67	
	ccgggccgcg tttttttttc aggtcgtcaa gatgctaccg ttcagg	46
<210>	68	
<211>	34	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<220>		
<221>	尚未归类的特征	
<222>	(34) .. (34)	
<223>	3'端与抗体连接	
<400>	68	
	atagagcgag ccagtgctag ggtgagtggc caag	34
<210>	69	
<211>	34	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<220>		
<221>	尚未归类的特征	
<222>	(34) .. (34)	
<223>	3'端与抗体连接	
<400>	69	
	atagagcgag ccagtgctag ggtgagtggc caag	34
<210>	70	
<211>	16	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<400>	70	
	gcactggctc gctcta	16

<210>	71	
<211>	34	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<220>		
<221>	尚未归类的特征	
<222>	(34) .. (34)	
<223>	3'端与抗体连接	
<400>	71	
	atagagcgag ccagtgctag ggtgagtggc caag	34
<210>	72	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<220>		
<221>	尚未归类的特征	
<222>	(17) .. (17)	
<223>	3'端与Cy5连接	
<400>	72	
	gcactggctc gctctan	17
<210>	73	
<211>	34	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<220>		
<221>	尚未归类的特征	
<222>	(34) .. (34)	
<223>	3'端与抗体连接	
<400>	73	
	atagagcgag ccagtgctag ggtgagtggc caag	34
<210>	74	
<211>	8	
<212>	DNA	

<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 74	
gcactggc	8
<210> 75	
<211> 35	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<220>	
<221> 尚未归类的特征	
<222> (35) .. (35)	
<223> 3'端与抗体连接	
<400> 75	
catagagcga gccagtgcta gggtagtgg ccaag	35
<210> 76	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<220>	
<221> 尚未归类的特征	
<222> (17) .. (17)	
<223> 3'端与Cy5连接	
<400> 76	
gcactggctc gctctan	17
<210> 77	
<211> 35	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<220>	
<221> 尚未归类的特征	
<222> (35) .. (35)	
<223> 3'端与抗体连接	

<400> 77	
caatgtccag gccagtgcta gggtagtgga ccaag	35
<210> 78	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 78	
gcactggctc gctcta	16
<210> 79	
<211> 35	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<220>	
<221> 尚未归类的特征	
<222> (35) .. (35)	
<223> 3'端与抗体连接	
<400> 79	
caagtcagtg accagtgcta gggtagtgga ccaag	35
<210> 80	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 80	
gcactggctc gctcta	16
<210> 81	
<211> 35	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<220>	
<221> 尚未归类的特征	
<222> (1) .. (1)	

- <223> 5'端与Cy5连接
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (18) .. (35)
 <223> n是a、c、g或t
 <400> 81
 acgtacgctc gtgccgcnnn nnnnnnnnnnn nnnnn 35
 <210> 82
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成寡核苷酸
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (17) .. (17)
 <223> 3'端与Cy3连接
 <400> 82
 gcggcacgag cgtacgn 17
 <210> 83
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成寡核苷酸
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (1) .. (1)
 <223> 5'端与Cy5连接
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (18) .. (35)
 <223> n是a、c、g或t
 <400> 83
 acctgcgctc gtgccgcnnn nnnnnnnnnnn nnnnn 35
 <210> 84
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<400>	84	
	gcggcacgag cgtacg	16
<210>	85	
<211>	35	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<220>		
<221>	尚未归类的特征	
<222>	(1) .. (1)	
<223>	5'端与Cy5连接	
<220>		
<221>	尚未归类的特征	
<222>	(18) .. (35)	
<223>	n是a、c、g或t	
<400>	85	
	agcatcgctc gtgccgcnnn nnnnnnnnnnn nnnnn	35
<210>	86	
<211>	16	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<400>	86	
	gcggcacgag cgtacg	16
<210>	87	
<211>	50	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<220>		
<221>	尚未归类的特征	
<222>	(1) .. (1)	
<223>	5'端与抗体连接	
<400>	87	

gaaccggtga gtgggatagc gctacgcctg aacggtagca tcttgacgac	50
<210> 88	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<220>	
<221> 尚未归类的特征	
<222> (31) .. (31)	
<223> c是双脱氧胞苷	
<400> 88	
tttttagtcg tcaagatgct accgttcagg c	31
<210> 89	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 89	
cctgaacggt agcatcttga cgac	24
<210> 90	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<220>	
<221> 尚未归类的特征	
<222> (31) .. (31)	
<223> c是双脱氧胞苷	
<400> 90	
tttttagtcg tcaagatgct accgttcagg c	31
<210> 91	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	

<400> 91	
cctgaacggg agcatcttga cgac	24
<210> 92	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<220>	
<221> 尚未归类的特征	
<222> (32) .. (32)	
<223> c是双脱氧胞苷	
<400> 92	
tttttatgtc gtcaagatgc taccgttcag gc	32
<210> 93	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 93	
cctgaacggg agcatcttga cgac	24
<210> 94	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 94	
atgcacgtcg tcaagatgct accggt	26
<210> 95	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 95	
cctgaacggg agcatcttga cgac	24
<210> 96	

<211> 27	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 96	
atgcatcgtc gtcaagatgc taccgtt	27
<210> 97	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 97	
cctgaacggt agcatcctga cgacg	25
<210> 98	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 98	
atgcacgtcg tcaagatgct accgtt	26
<210> 99	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 99	
cctgaacggt agcatcctga cgacg	25
<210> 100	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 100	
atgcatcgtc gtcaagatgc taccgtt	27

<210> 101	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 101	
cctgaacggg agcatcctga cgacgtgcat	30
<210> 102	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 102	
atgcacgtcg tcaagatgct accggt	26
<210> 103	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 103	
cctgaacggg agcatcctga cgacgtgcat	30
<210> 104	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 104	
atgcatcgtc gtcaagatgc taccggt	27
<210> 105	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 105	

cctgaacggg agcatcctga cgacgtgcat	30
<210> 106	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 106	
atgcacgtcg tcaagatgct accggt	26
<210> 107	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 107	
cctgaacggg agcatcctga cgacg	25
<210> 108	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 108	
atgcatcgtc gtcaagatgc tacggt	27
<210> 109	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 109	
cctgaacggg agcatcctga cgactgcat	29
<210> 110	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	

<400> 110	
atgcacgtcg tcaagatgct accgtt	26
<210> 111	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 111	
cctgaacggg agcatcttga cgacg	25
<210> 112	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 112	
atgcatcgtc gtcaagatgc taccgtt	27
<210> 113	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 113	
cctgaacggg agcatcttga cgacgtgcat	30
<210> 114	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 114	
atgcacgtcg tcaagatgct accgtt	26
<210> 115	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	

<223> 合成寡核苷酸	
<400> 115	
cctgaacggg agcatcctga cgacga	26
<210> 116	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 116	
atgcatcgtc gtcaagatgc taccgtt	27
<210> 117	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 117	
cctgaacggg agcatcctga cgacgtgcat	30
<210> 118	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 118	
atgcacgtcg tcaagatgct accgtt	26
<210> 119	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 119	
cctgaacggg agcatcctga cgacgatgca t	31
<210> 120	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 人工序列	

<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<400>	120	
	atgcatcgtc gtcaagatgc taccgtt	27
<210>	121	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<400>	121	
	cctgaacggg agcatccttga cgacgtgcat	30
<210>	122	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<400>	122	
	atgcacgtcg tcaagatgct accggt	26
<210>	123	
<211>	31	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<400>	123	
	cctgaacggg agcatccttga cgacgatgca t	31
<210>	124	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<400>	124	
	atgcatcgtc gtcaagatgc taccgtt	27
<210>	125	
<211>	55	
<212>	DNA	

<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 125	
atgctaccgt taattattac tgaacatac actaaagata acattattct gcaag	55
<210> 126	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 126	
tgaacatac actaaaga	18
<210> 127	
<211> 13	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 127	
gcatcttgca gaa	13
<210> 128	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 128	
ttttgttctg caagatgcta ccgttcgg	28
<210> 129	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 129	
ttttgtttct gcaagatgct accgttcgg	29
<210> 130	
<211> 30	

<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 130	
ttttgctttc tgcaagatgc taccgttcgg	30
<210> 131	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 131	
ttttgtcttt ctgcaagatg ctaccgttcg g	31
<210> 132	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 132	
ttttgcctct ttctgcaaga tgctaccgtt cgg	33
<210> 133	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 133	
ttttgtttcc tctttctgca agatgctacc gttcgg	36
<210> 134	
<211> 38	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 134	
ttttgccttt cctctttctg caagatgcta ccgttcgg	38
<210> 135	

<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 135	
ttttgttcct ttcctctttc tgcaagatgc taccgttcgg	40
<210> 136	
<211> 41	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 136	
ttttgcttcc tttcctcttt ctgcaagatg ctaccgttcg g	41
<210> 137	
<211> 42	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 137	
ttttgtcttc ctttctcttt tctgcaagat gctaccgttc gg	42
<210> 138	
<211> 44	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 138	
ttttgcctct tcctttcttc tttctgcaag atgctaccgt tcgg	44
<210> 139	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 139	
ttttattctg caagatgcta ccgttcgg	28

<210>	140	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<400>	140	
	ttttatttct gcaagatgct accgttcgg	29
<210>	141	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<400>	141	
	ttttactttc tgcaagatgc taccgttcgg	30
<210>	142	
<211>	31	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<400>	142	
	ttttatcttt ctgcaagatg ctaccgttcg g	31
<210>	143	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<400>	143	
	ttttacctct ttctgcaaga tgctaccgtt cgg	33
<210>	144	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<400>	144	

ttttatttcc tctttctgca agatgctacc gttcgg	36
<210> 145	
<211> 38	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 145	
ttttacccttt cctctttctg caagatgcta ccgttcgg	38
<210> 146	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 146	
ttttattcct ttctctttc tgcaagatgc taccgttcgg	40
<210> 147	
<211> 41	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 147	
ttttacttcc tttcctcttt ctgcaagatg ctaccgttcg g	41
<210> 148	
<211> 42	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 148	
ttttatcttc ctttctcttt tctgcaagat gctaccgttc gg	42
<210> 149	
<211> 44	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	

<400> 149	
ttttacctct tcctttcctc tttctgcaag atgctaccgt tcgg	44
<210> 150	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<220>	
<221> 尚未归类的特征	
<222> (29) .. (29)	
<223> n = 二脱氧C	
<400> 150	
ttttattctg caagatgcta ccgttcggg	29
<210> 151	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<220>	
<221> 尚未归类的特征	
<222> (30) .. (30)	
<223> n = 二脱氧C	
<400> 151	
ttttatttct gcaagatgct accgttcggg	30
<210> 152	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<220>	
<221> 尚未归类的特征	
<222> (31) .. (31)	
<223> n = 二脱氧C	
<400> 152	
ttttactttc tgcaagatgc tacgttcgg n	31
<210> 153	

- <211> 36
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成寡核苷酸
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (36) .. (36)
 <223> n = 二脱氧C
 <400> 153
 atagcagtcc agccgaacgg tagcatcttg cagaan 36
 <210> 154
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成寡核苷酸
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (45) .. (45)
 <223> n = 二脱氧C
 <400> 154
 ttttagcgat taagcgtgaa cttctgcaag atgctaccgt tcggn 45
 <210> 155
 <211> 46
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成寡核苷酸
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (46) .. (46)
 <223> n = 二脱氧C
 <400> 155
 ttttatgcga ttaagcgtga acttctgcaa gatgctaccg ttcggn 46
 <210> 156
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<220>		
<221>	尚未归类的特征	
<222>	(47) .. (47)	
<223>	n = 二脱氧C	
<400>	156	
	ttttactgcg attaagcgtg aacttctgca agatgctacc gttcggg	47
<210>	157	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<220>		
<221>	尚未归类的特征	
<222>	(36) .. (36)	
<223>	n = 二脱氧C	
<400>	157	
	atagcagtcc agccgaacgg tagcatcttg cagaan	36
<210>	158	
<211>	45	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<220>		
<221>	尚未归类的特征	
<222>	(45) .. (45)	
<223>	n = 二脱氧C	
<400>	158	
	ttttacgcta attcgcaactt gttctgcaag atgctaccgt tcggg	45
<210>	159	
<211>	46	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<220>		

<221> 尚未归类的特征	
<222> (46) .. (46)	
<223> n = 二脱氧C	
<400> 159	
ttttatcgct aattcgcaact tgttctgcaa gatgctaccg ttcggn	46
<210> 160	
<211> 47	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<220>	
<221> 尚未归类的特征	
<222> (47) .. (47)	
<223> n = 二脱氧C	
<400> 160	
ttttactcgc taattcgcac ttgttctgca agatgctacc gttcggg	47
<210> 161	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 161	
gttcacgctt aatcgc	16
<210> 162	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 162	
cgctaattcg cacttg	16
<210> 163	
<211> 55	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	

<400> 163	
acattaaaat cctagcacag ggactcaatt attactgaaa catacactaa agata	55
<210> 164	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 164	
ctcatcagca cagctatgat gataatgta tctt	34
<210> 165	
<211> 55	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 165	
acattataga actcggcctg gatgataatt attactgaaa catacactaa agata	55
<210> 166	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 166	
ctgattggtc aggattcaga taatggtatc tt	32
<210> 167	
<211> 55	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 167	
acattatcaa agctggcaaa tcgtccaatt attactgaaa catacactaa agata	55
<210> 168	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	

<223> 合成寡核苷酸	
<400> 168	
tggccaatgc accttgagcc taatggtatc tt	32
<210> 169	
<211> 55	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 169	
acattatgat ttccaggttg gctttgaatt attactgaaa catacactaa agata	55
<210> 170	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 170	
atagttggag cgctttgtca taatggtatc tt	32
<210> 171	
<211> 55	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 171	
acattatttc gaagccacgt gacattaatt attactgaaa catacactaa agata	55
<210> 172	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 172	
ctgtggtgac aggttttcca taatggtatc tt	32
<210> 173	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	

<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<400>	173	
catacactaa agataacat		19
<210>	174	
<211>	35	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<400>	174	
atagcagtcc agccgaacgg tagcatcttg cagaa		35

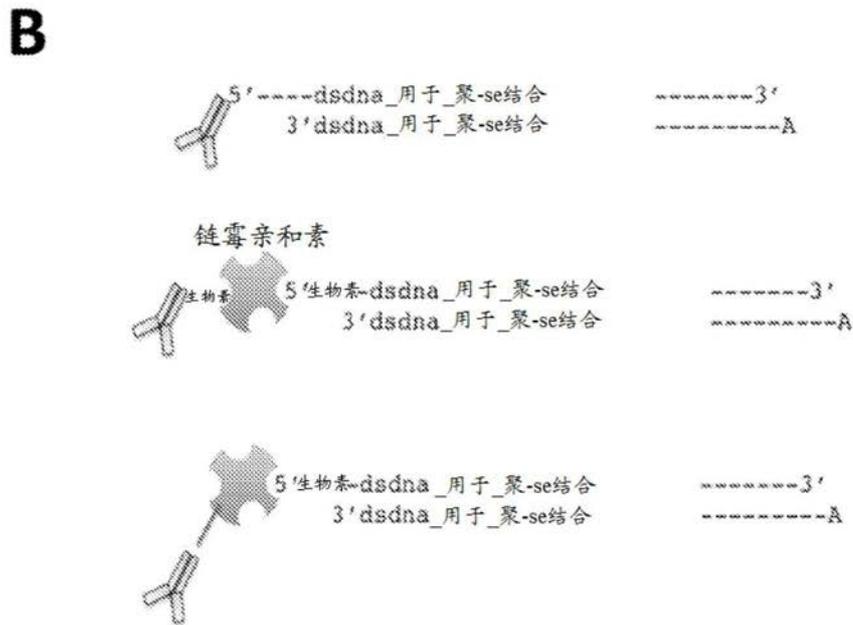
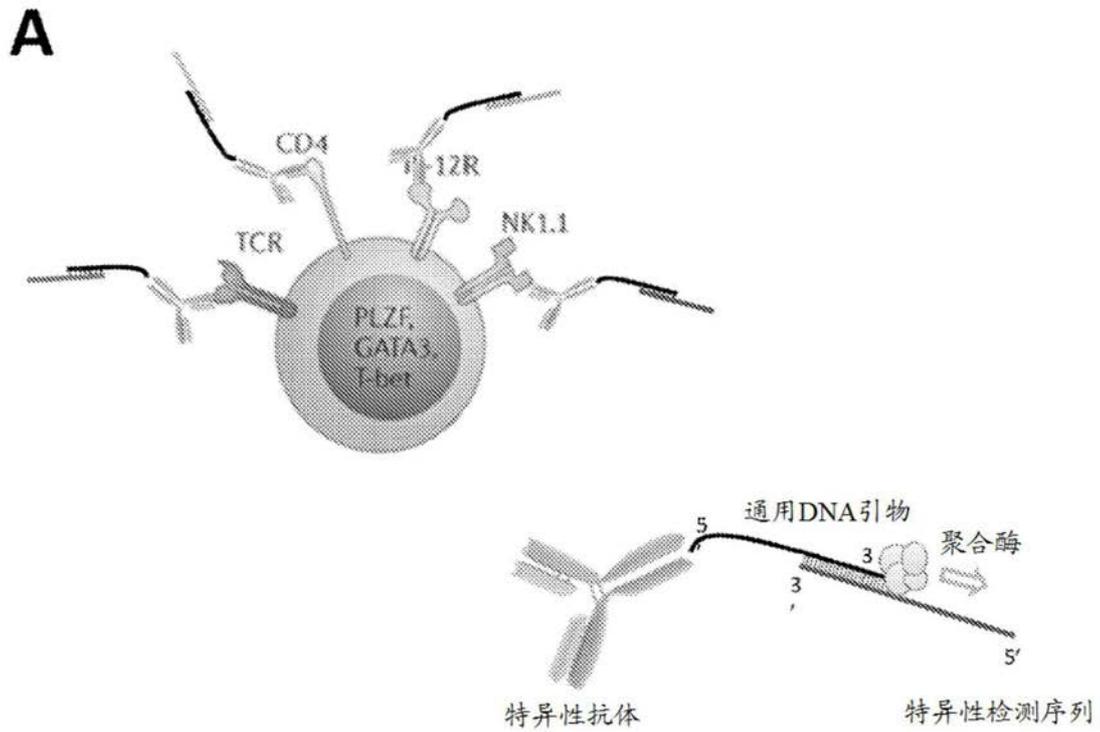


图1

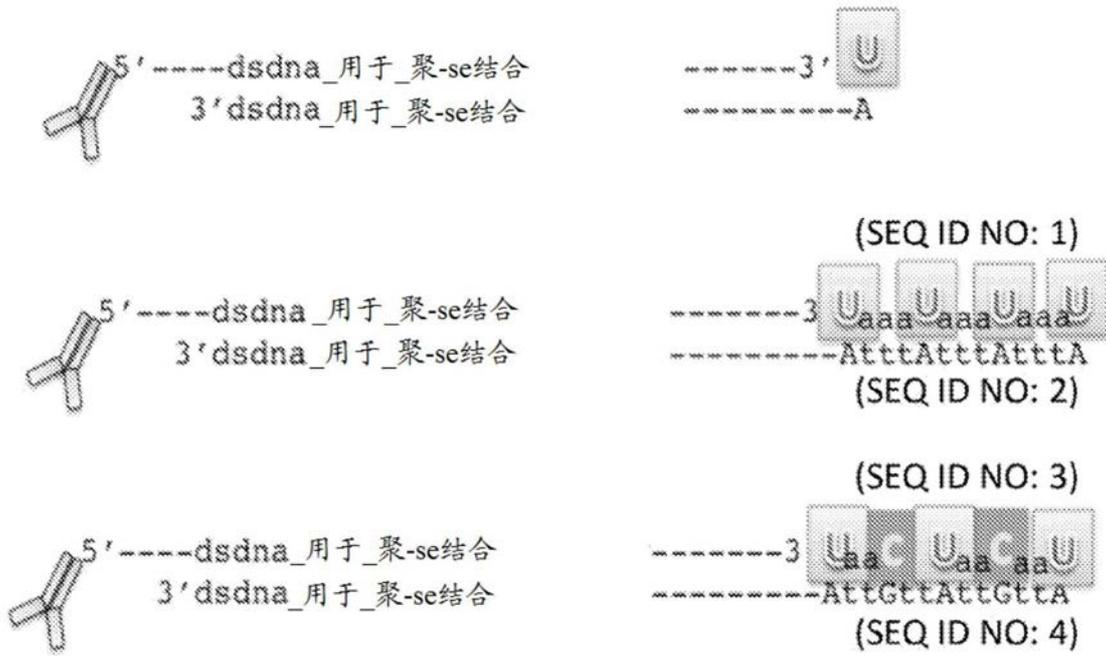


图2

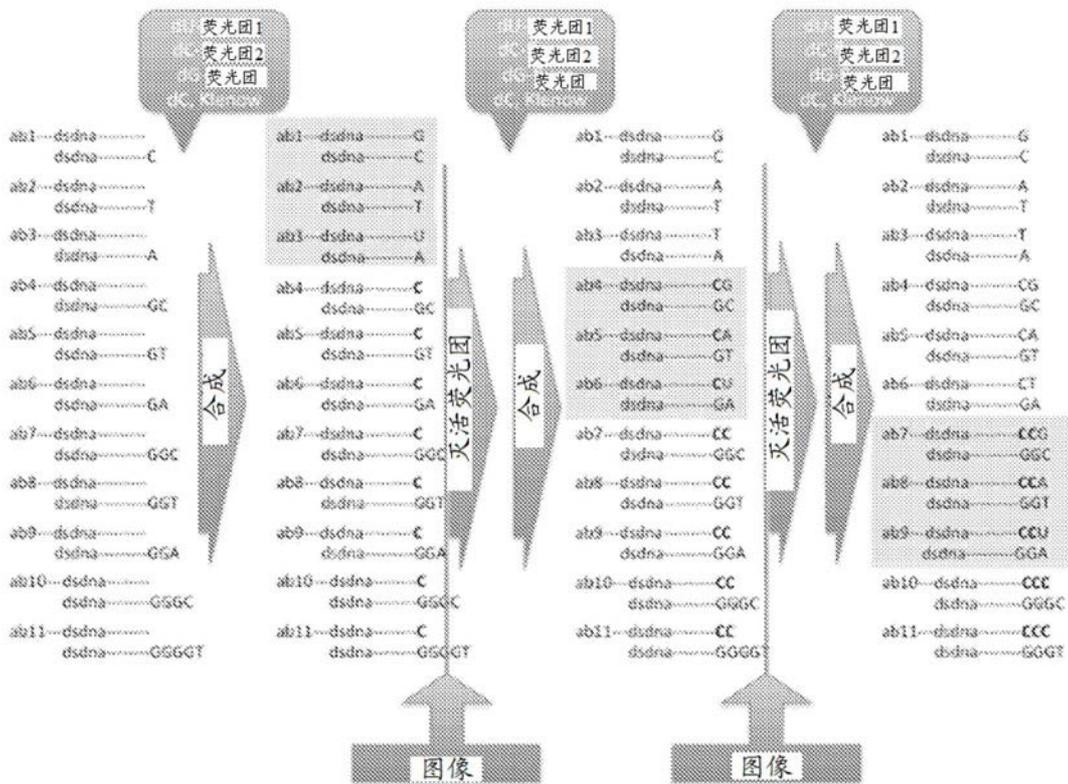


图3

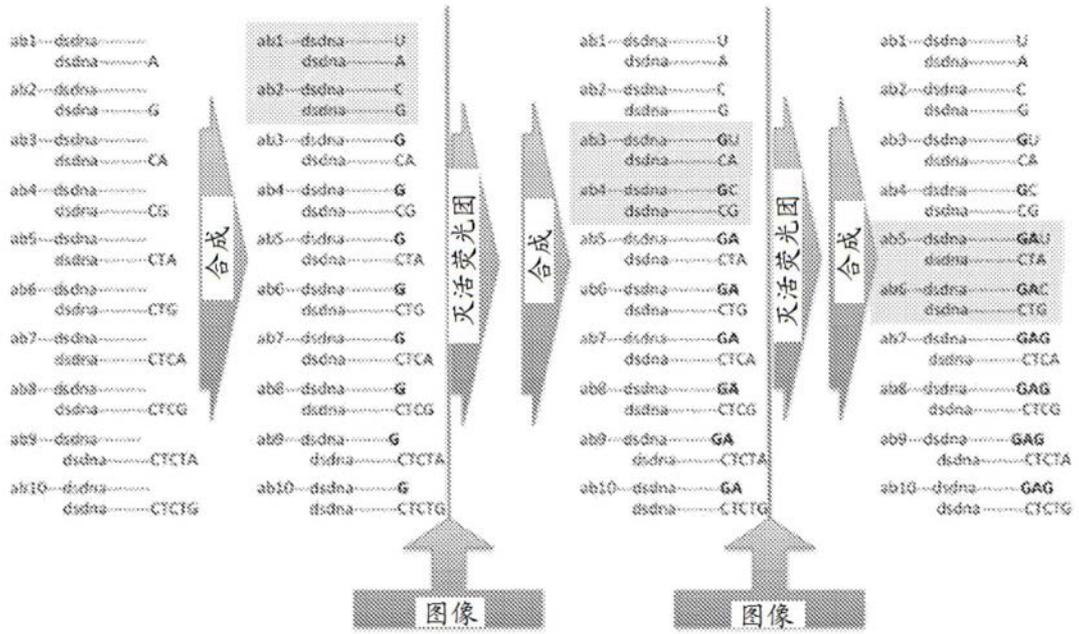


图4

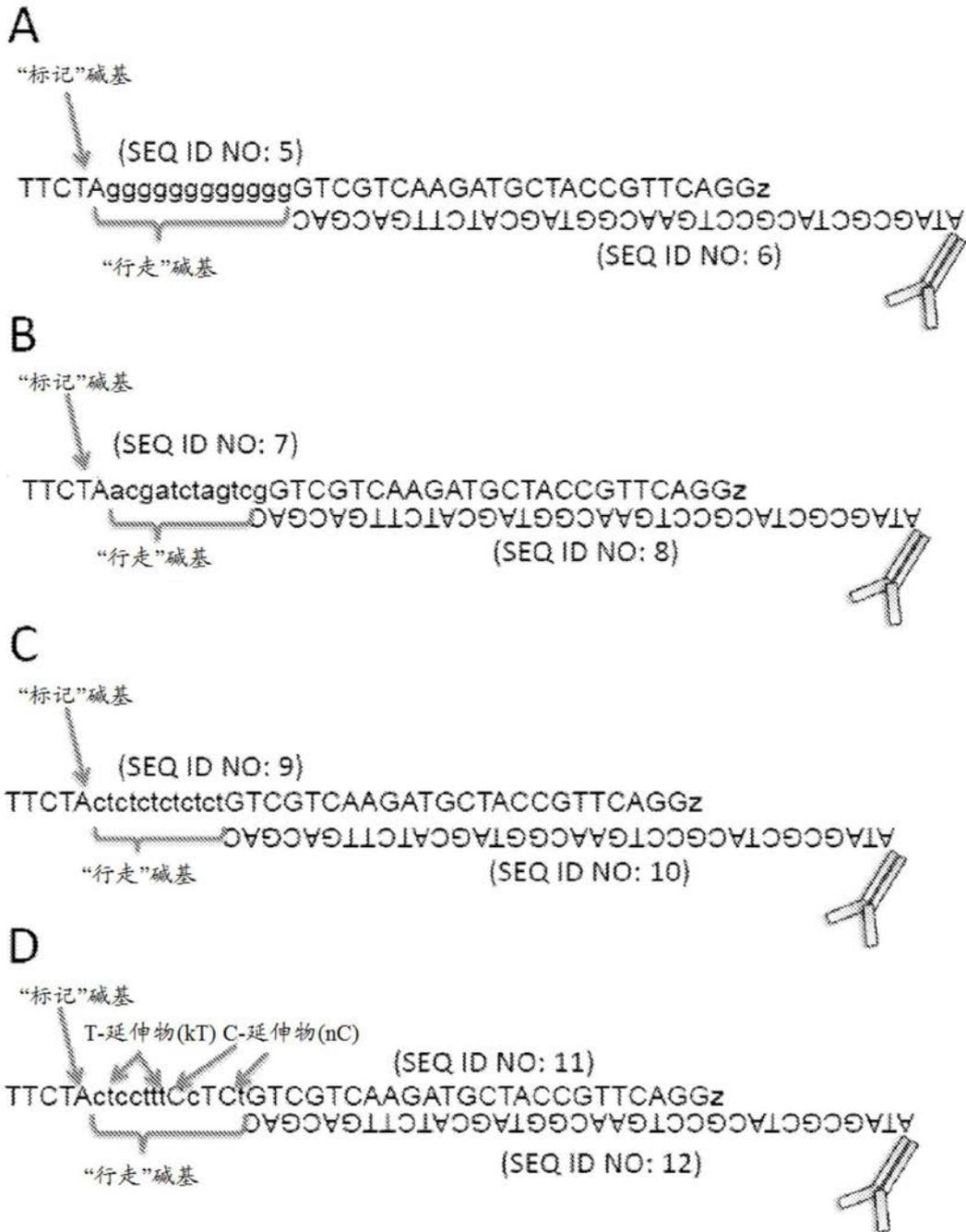


图5A-5D



图6

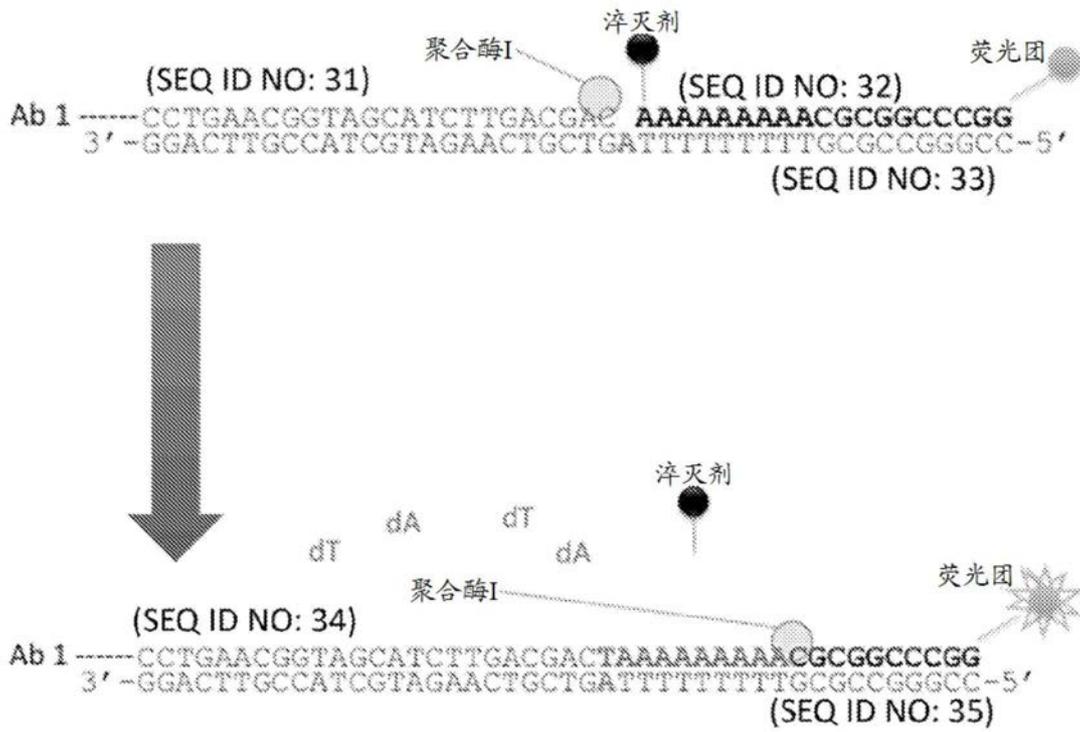


图7

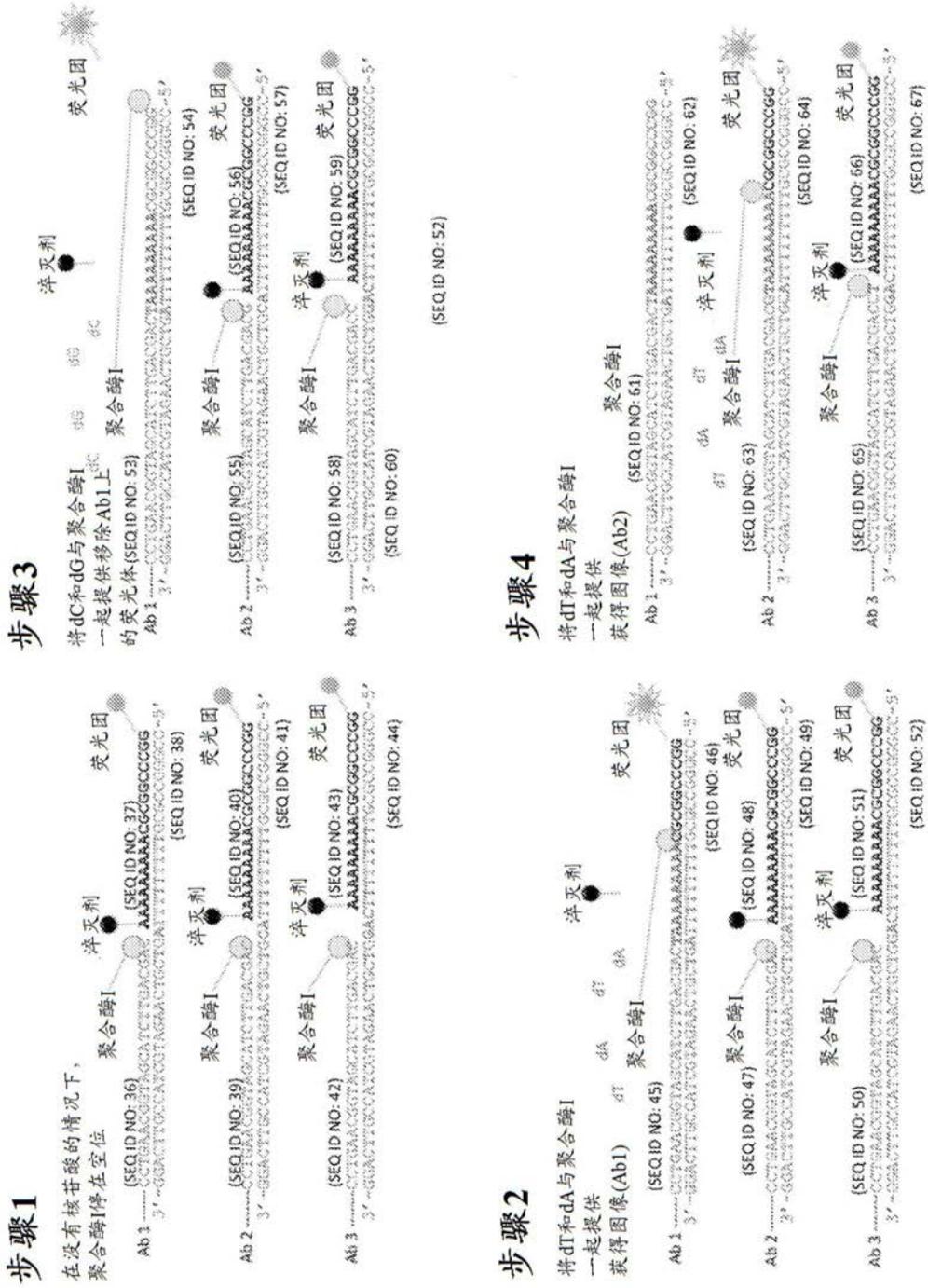


图8

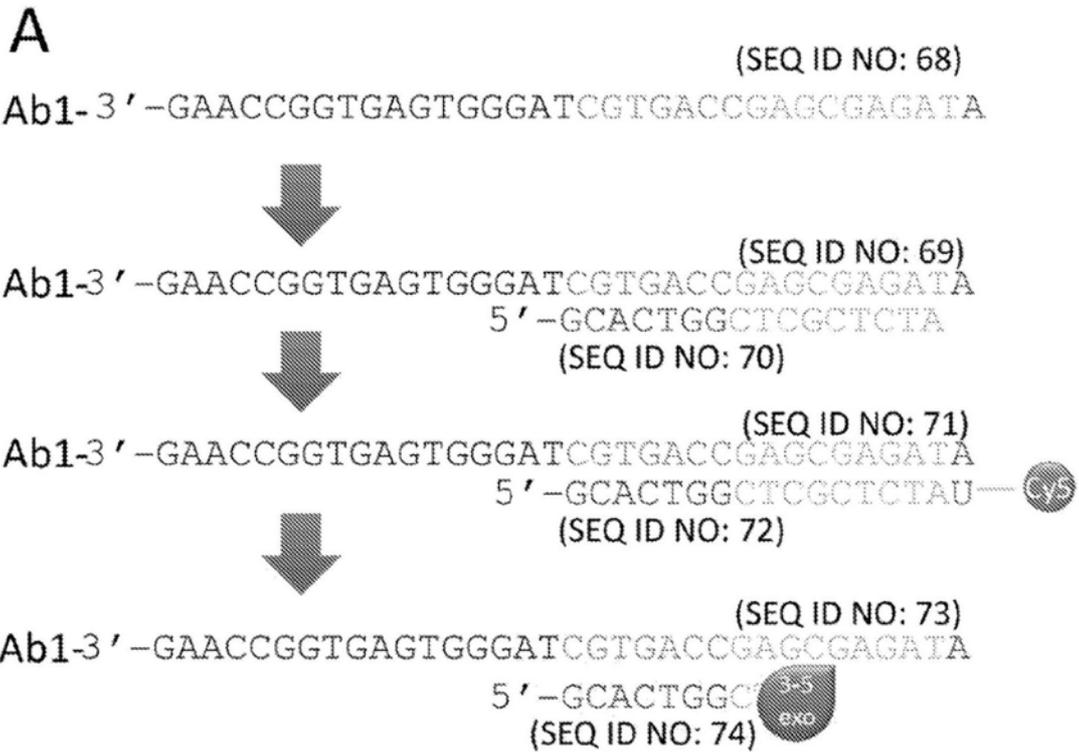


图9A-9B

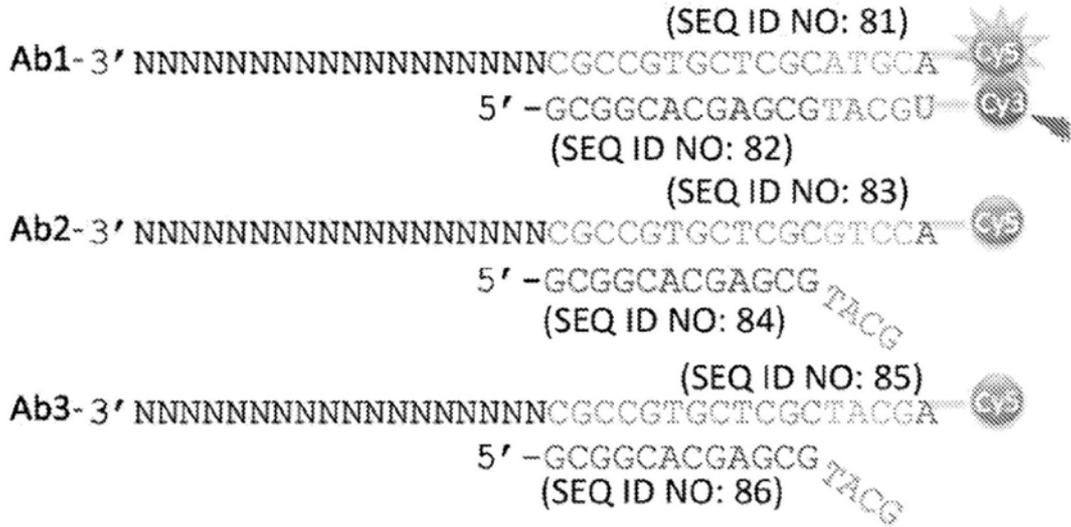


图10

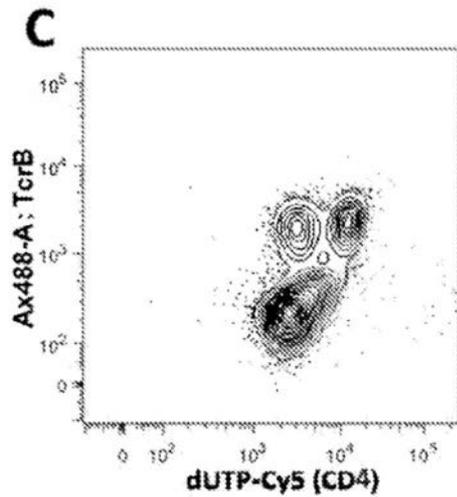
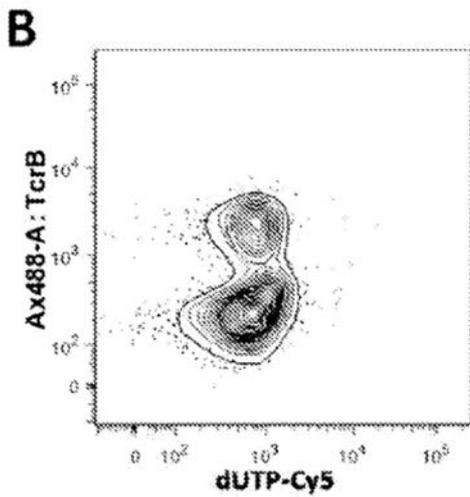


图11A-11C

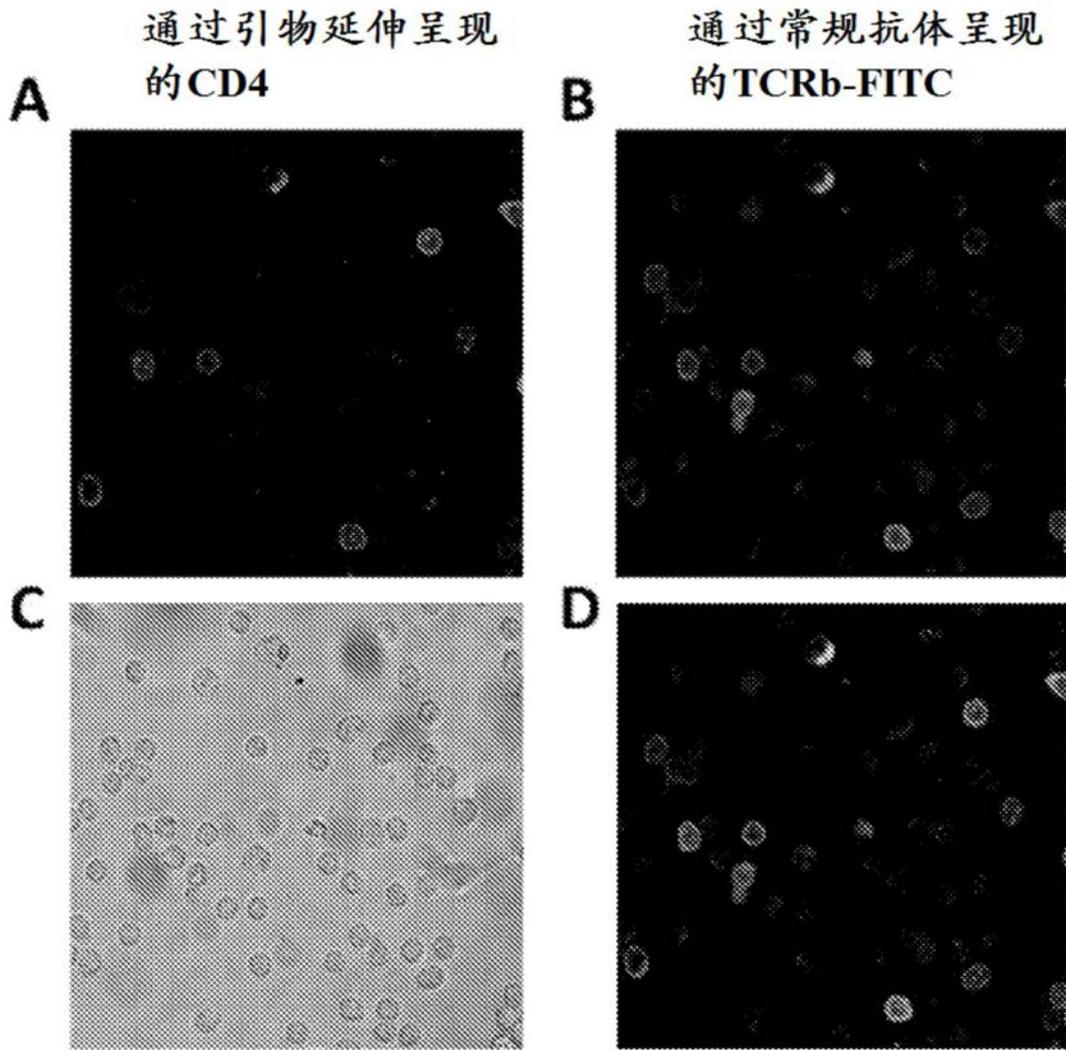


图12A-12D

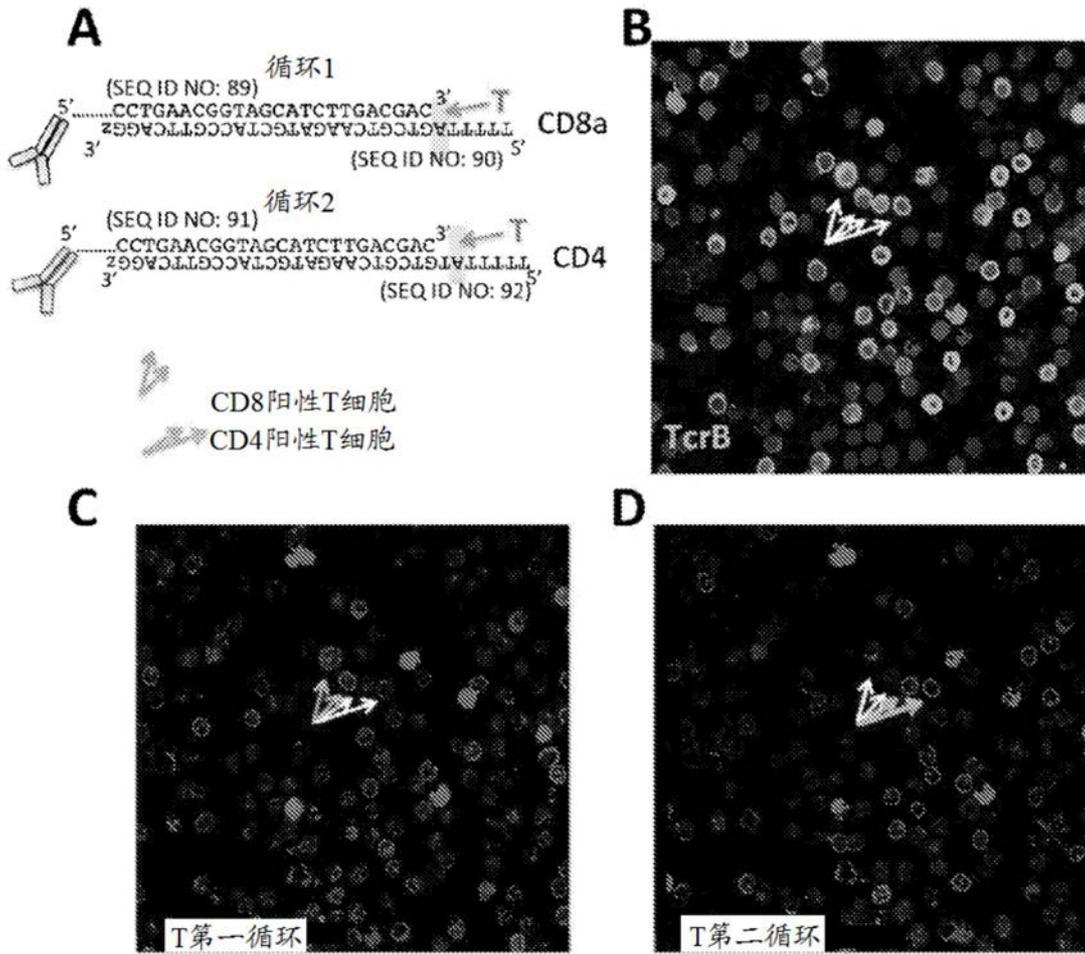


图13A-13D

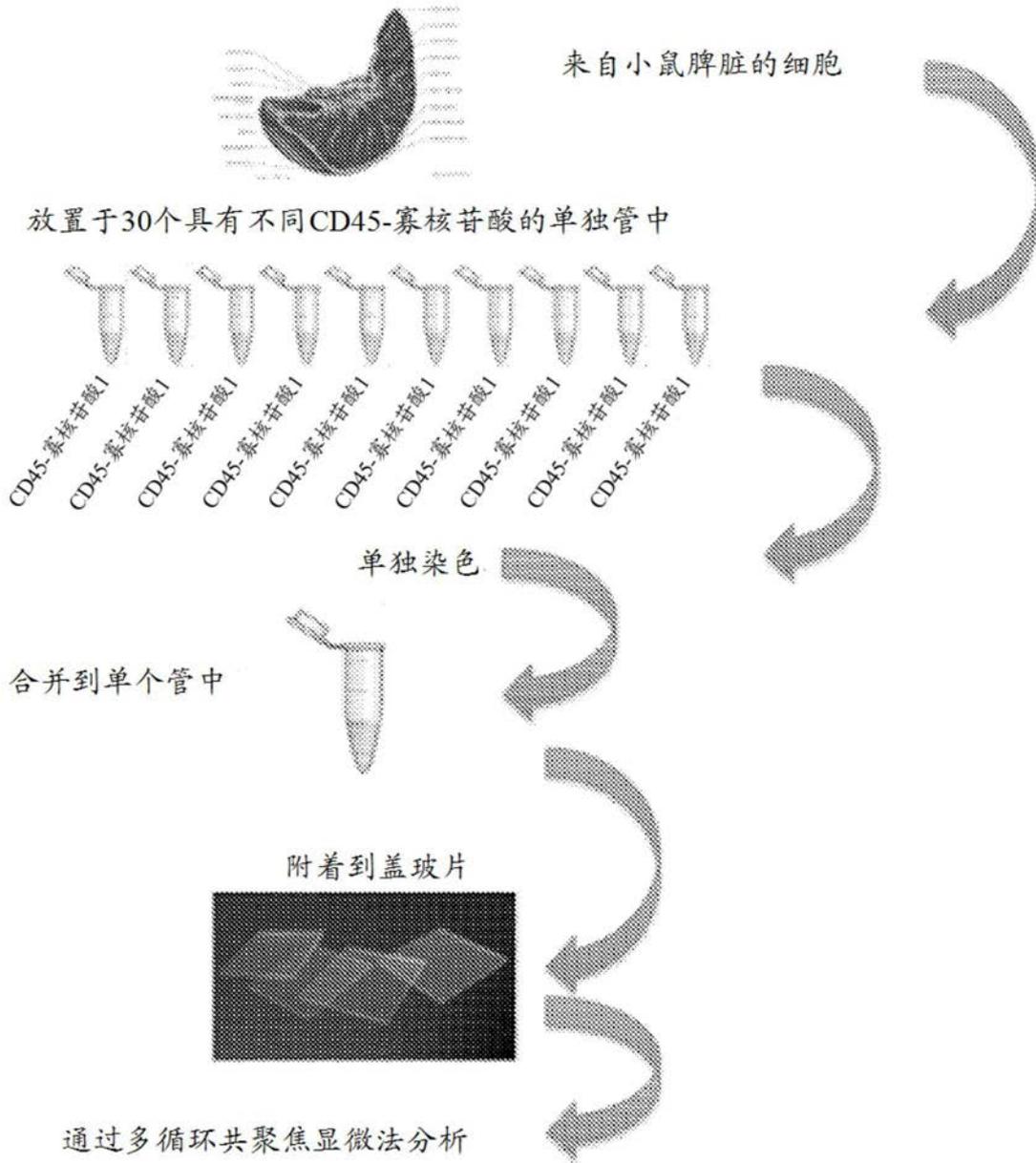


图14

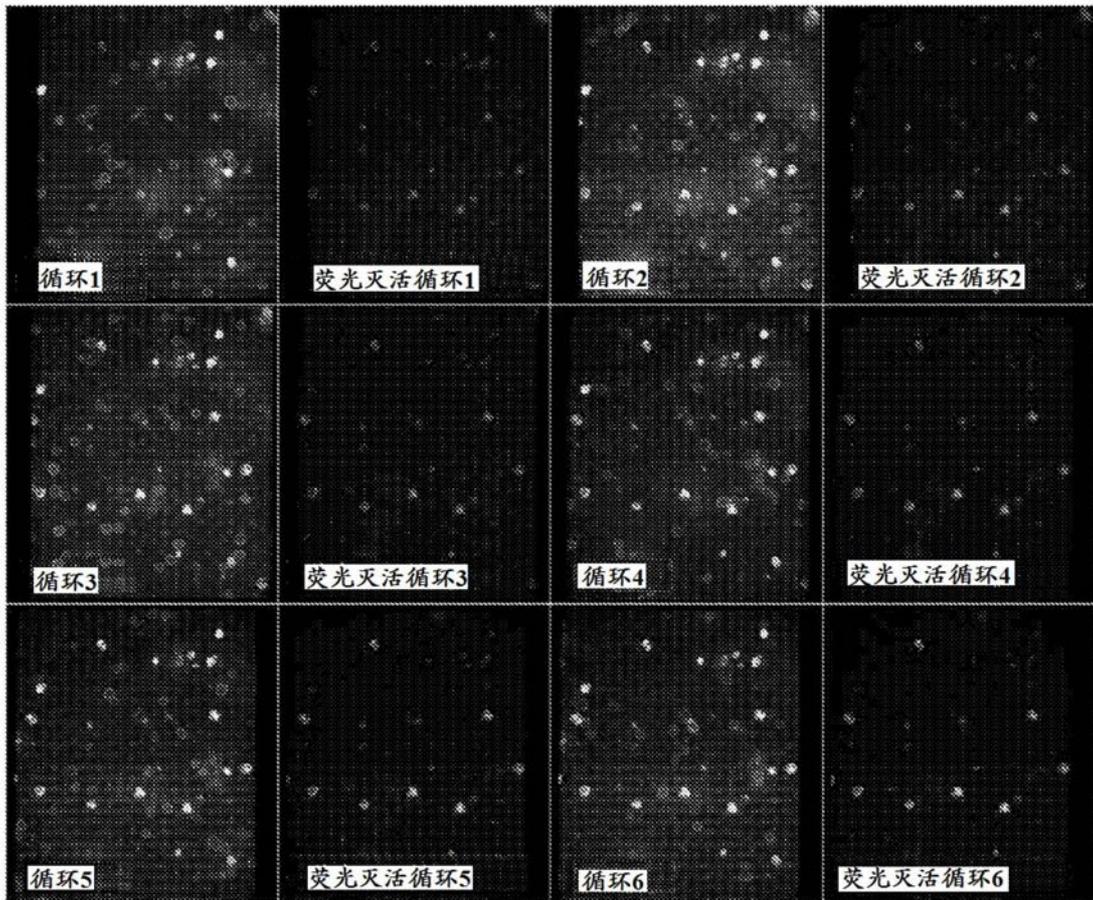


图15

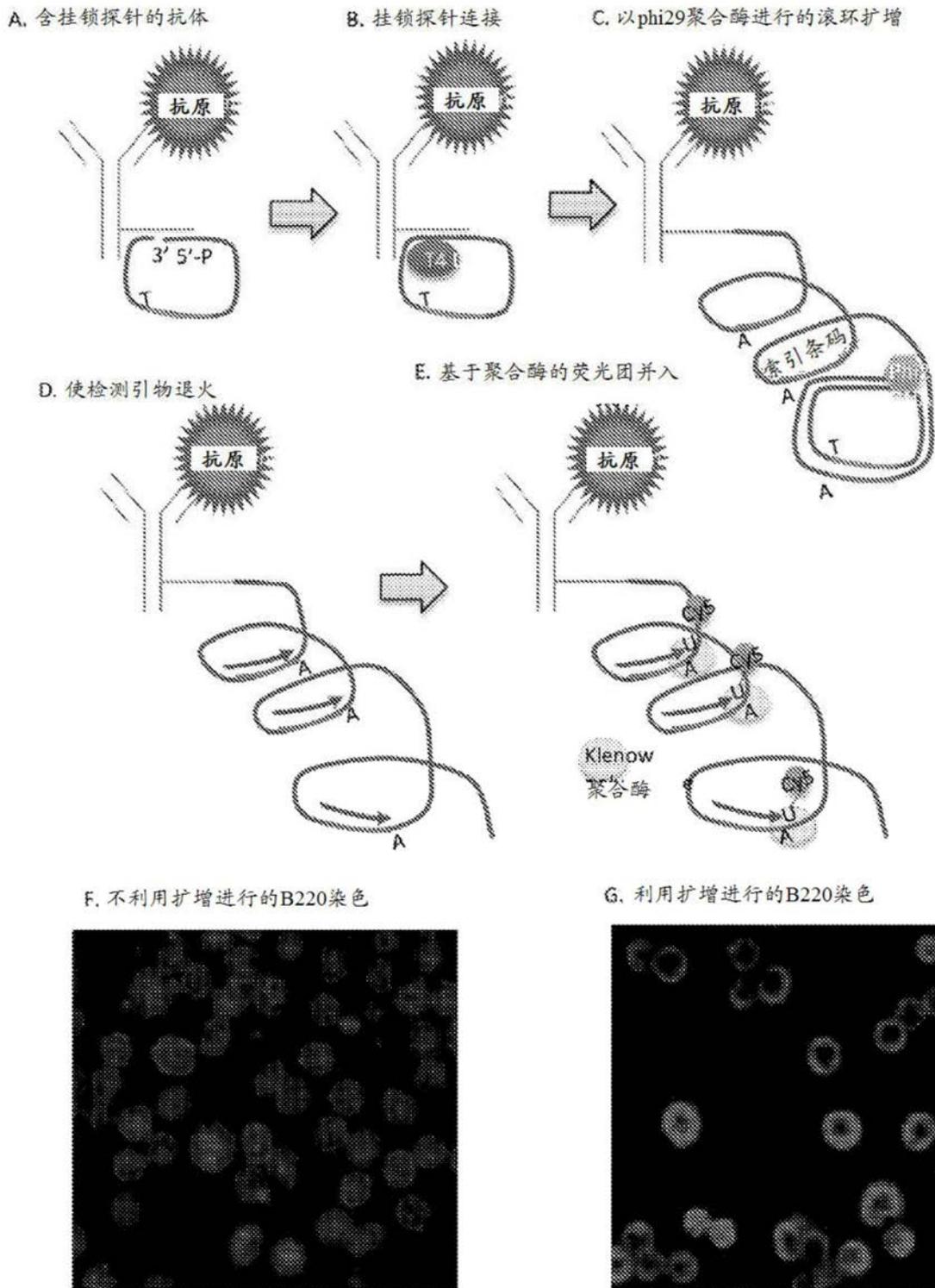


图16

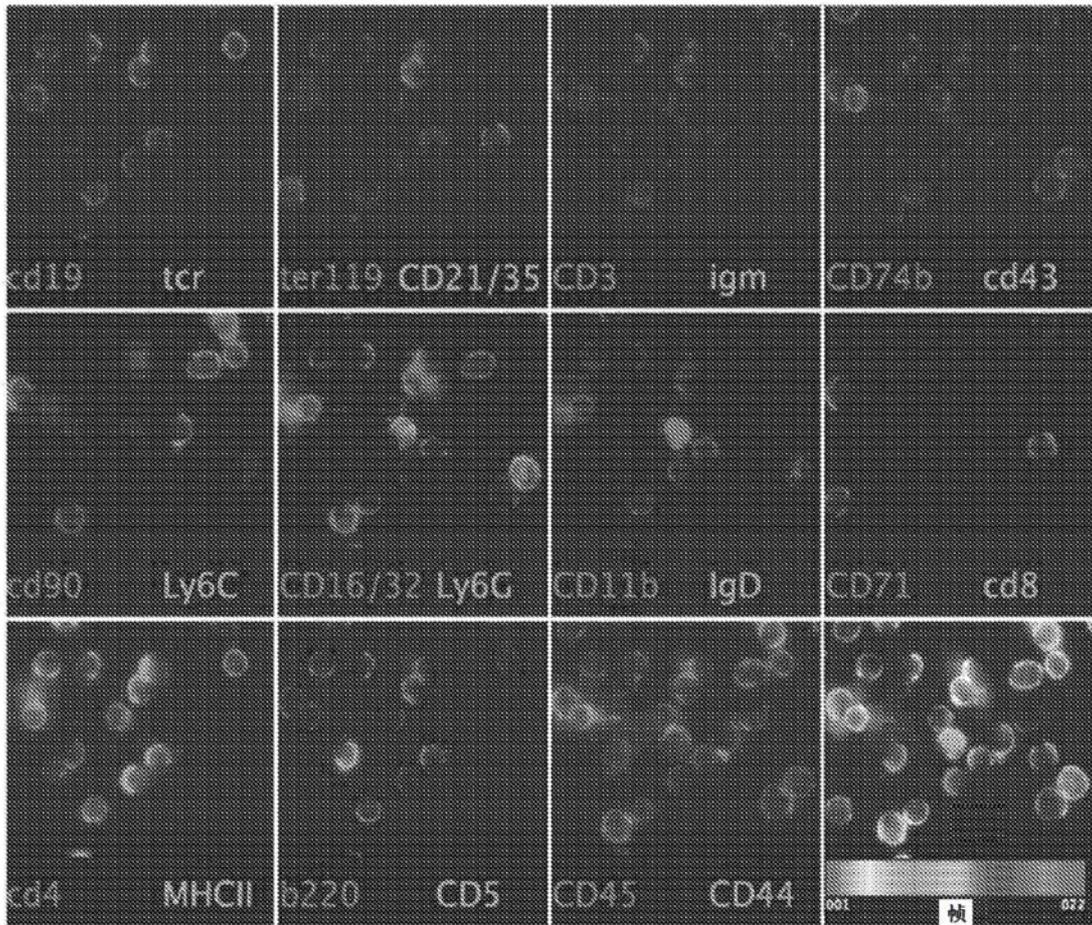


图17

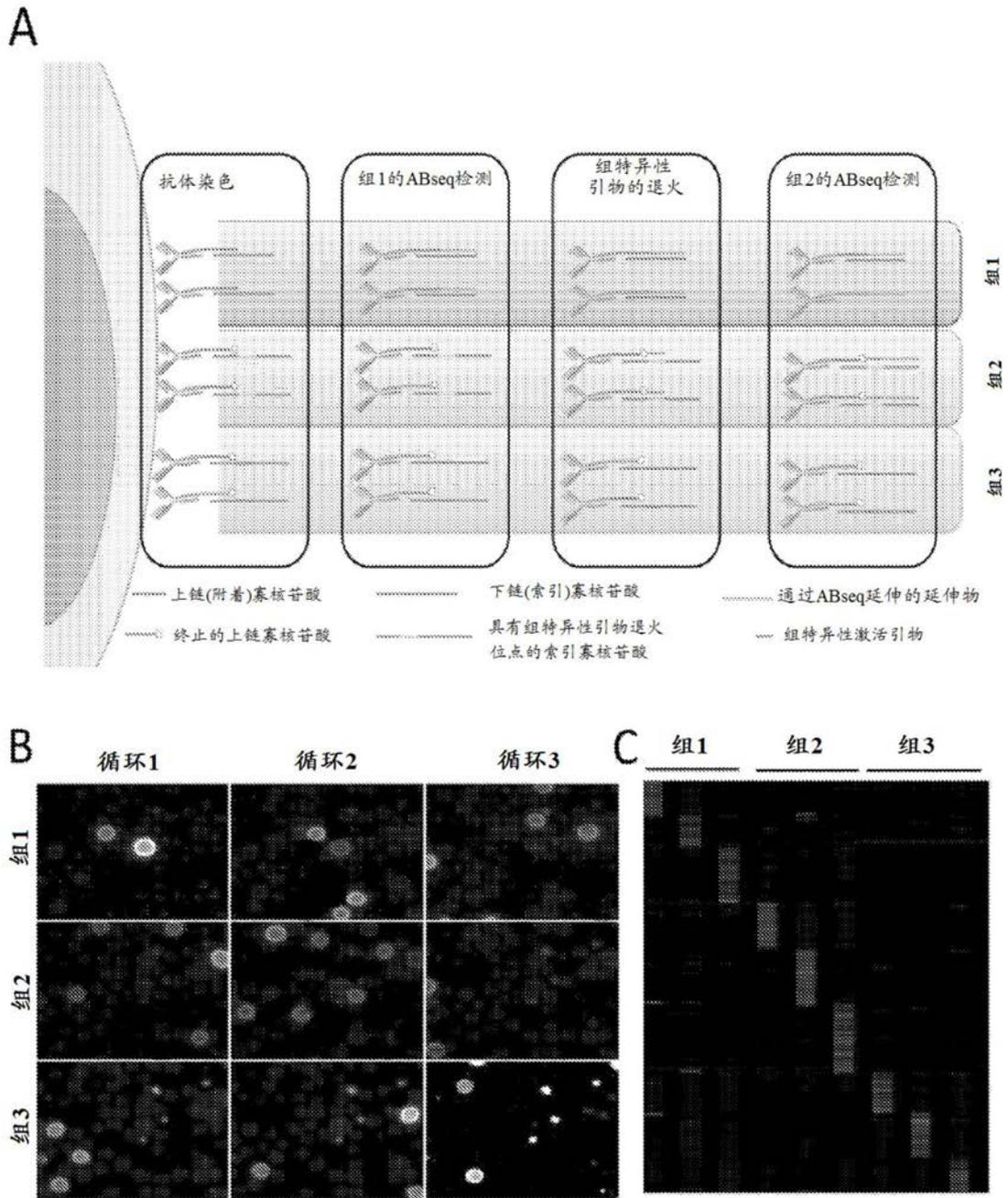


图18

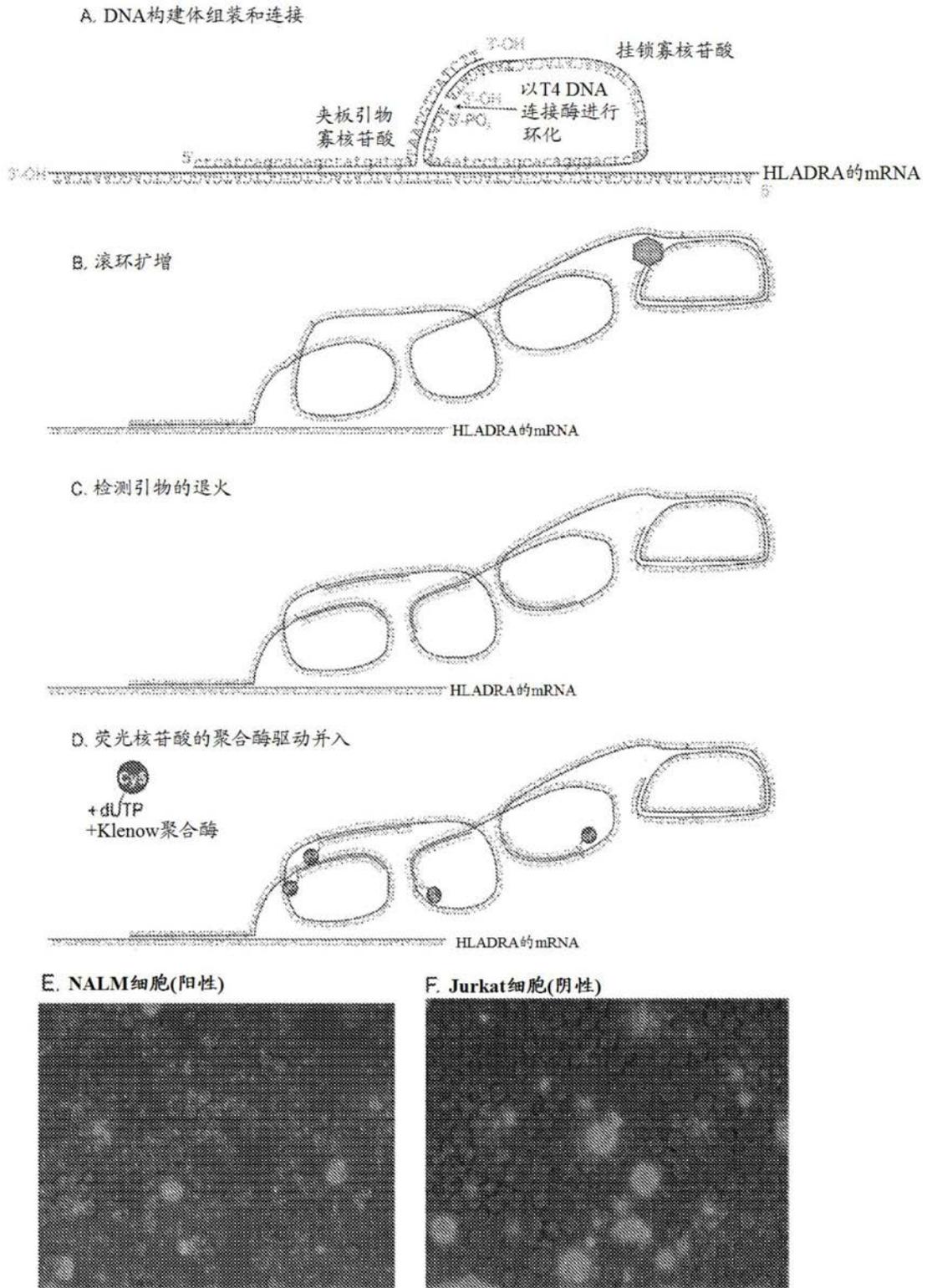


图19

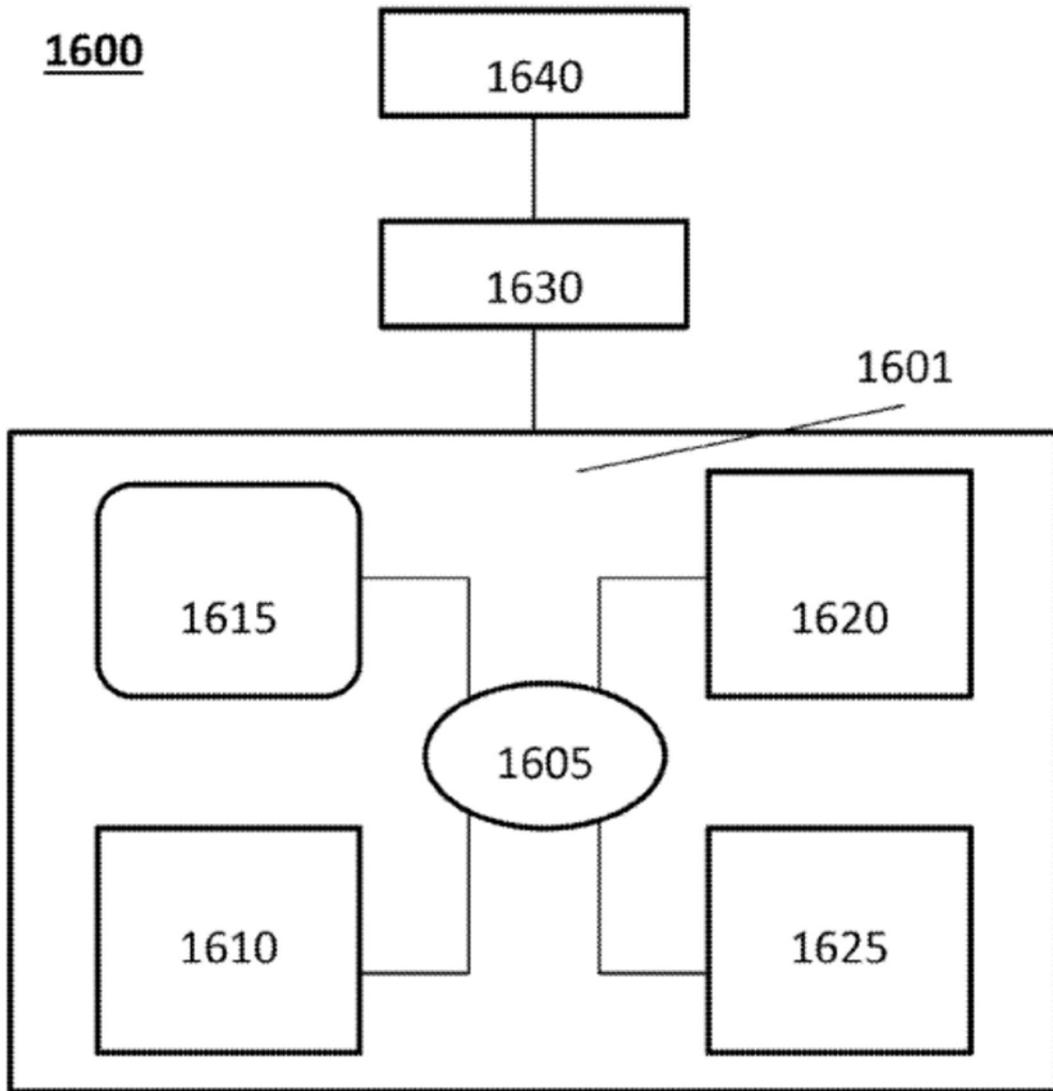


图21